

Eigenschaften und Funktionen des humanen monothiol Glutaredoxin 3



Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Dipl.-Biol. Petra Haunhorst
aus Georgsmarienhütte

Marburg / Lahn
Juli 2010

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2006 bis Juni 2010 in Marburg am Institut für klinische Zytobiologie unter der Leitung von Herrn Dr. Christopher Horst Lillig und der Betreuung von Frau Prof. Dr. Regine Kahmann durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
angenommen am: 16.09.2010

Erstgutachter: Dr. Christopher Horst Lillig
Zweitgutachterin: Prof. Dr. Regine Kahmann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.09.2010

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Eigenschaften und Funktionen des humanen monothiol Glutaredoxin 3“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in ihrer jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinem sonstigen Prüfungszweck gedient.

(Ort, Datum)

(Petra Haunhorst)

Teile dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht in:

Originalbeiträge:

Haunhorst, P., Berndt, C., Eitner, S., Godoy, J. R., Lillig, C. H. *Characterization of the human monothiol glutaredoxin 3 (PICOT) as iron-sulfur protein*. Biochim. Biophys. Res. Commun. **394**(2), 372 – 376 (2010).

Godoy, J. R., Funke, M., Ackermann, W., **Haunhorst, P.**, Oesteritz, S., Capani, F., Elsässer, H. P., Lillig, C. H. *Redox atlas of the mouse: Immunohistochemical detection of glutaredoxin-, peroxiredoxin-, and thioredoxin-family proteins in various tissues of the laboratory mouse*. Biochim. Biophys. Acta (2010). doi: 10.1016/j.bbagen.2010.05.006.

Konferenzbeiträge:

Haunhorst, P., Hudemann, C., Eitner, S., Funke, M., and Lillig, C. H., *Glutaredoxin 3: Structure and function*. International Symposium of the SFB 593: Mechanisms of Cellular Compartmentalization. 24. – 25. September 2009 Marburg, Deutschland

Cherkasov, V., **Haunhorst, P.**, Godoy-Berthet, J. R., Schuette, L. D., Hudemann, C., Lönn, M. E., and Lillig, C. H., *Redox compartmentalization of the mammalian cell: Subcellular localization of human Glutaredoxin isoforms*. Eur. J. Cell Biol. 87 (37), 2008. 31st Annual Meeting of the German Society for Cell Biology, 12. – 15. März 2008, Marburg, Deutschland

Haunhorst, P., Hudemann, C., Lönn, M. E., Bill, E., Berndt, C., and Lillig, C. H., *Iron sulfur glutaredoxins*, 4th International Meeting on Biogenesis of Iron Sulfur Proteins: Cluster Assembly and Regulation, 9. – 12. Juli 2007, Villard des Lans, Frankreich

Zusammenfassung

Glutaredoxine (Grx'e) als Proteine der Thioredoxin (Trx)-Familie sorgen für ein reduzierendes Milieu in Säugerzellen.

Die Familie der Glutaredoxine teilt sich in Monothiol-Grx'e (Grx3 und Grx5) und Dithiol-Grx'e (Grx1 und Grx2) auf, die im Nukleus, im Zytoplasma oder in den Mitochondrien lokalisiert sind. Grx'e sind an einer Vielzahl von biologischen Prozessen, wie beispielsweise der Signaltransduktion, beteiligt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das bisher kaum beschriebene monothiol Glutaredoxin 3 detaillierter untersucht und biochemisch charakterisiert. Darüber hinaus wurden mögliche Funktionen von Grx3 *in vivo* untersucht.

In den Datenbanken fanden sich zwei homologe Grx3-Sequenzen. Eine *in silico*-Analyse zeigte, dass es sich bei der einen Sequenz um die eines Pseudogens und bei der anderen um das codierende Gen handelte. In einer phylogenetischen Stammbaumanalyse stellte sich heraus, dass Grx3 ein hochkonserviertes Protein war. In Lokalisationsstudien wurde Grx3 als zytosolisches und nukleäres ubiquitär exprimiertes Protein identifiziert.

In den letzten Jahren wurde ein Zusammenhang zwischen Grx'en und Fe/S-Zentren beschrieben. In dieser Dissertation wurde erstmals die Koordination eines Fe/S-Zentrums für das humane Grx3 gezeigt. Tatsächlich zeigten biochemische Analysen, dass durch Grx3 2[2Fe-2S]-Zentren *in vitro* und *in vivo* koordiniert werden. Ferner zeigte sich, dass zwei Grx3-Moleküle durch die beiden Fe/S-Zentren dimerisierten.

Funktionell wurde Grx3 in der Literatur bisher als Protein zum Schutz vor einer Hypertrophie des Herzens beschrieben. Auch wurden Grx3 Funktionen in der Immunzellaktivierung zugeschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Hinweise für weitere Funktionen von Grx3 in der Zelle ermittelt. In der Analyse der differentiellen Genexpression in HeLa-Zellen nach Stimulation mit Phorbol ester (PMA) deutete sich ein Einfluss von Grx3 auf zytoskeletale Prozesse an. Eine Untersuchung des Migrationsverhaltens von Grx3 zeigte, dass HeLa-Zellen in Abwesenheit von Grx3 schneller migrierten. Durch seine exklusive Expression in den Germinativen Zentren von Lymphknoten und in der T-Zell-Zone der Milz könnte Grx3 eine Funktion in der inflammatorischen Antwort einnehmen. Der wohl deutlichste Effekt von Grx3 auf der Ebene zellulärer Prozesse konnte in der Verteilung von Eisen in der Zelle beschrieben

werden. Eine Reduktion des endogenen Grx3-Levels durch siRNA resultierte in Defekten in der Übertragung von Fe/S-Zentren auf Zielproteine und in einem für Eisenmangel typischen Phänotyp in HeLa-Zellen.

Diese Resultate könnten bei der Aufklärung von bisher kaum beschriebenen Prozessen des zellulären Eisenmetabolismus helfen, wie z. B. der Verteilung von Eisen vom „freien“ Eisenpool auf Proteine. Ein zentraler Punkt in diesen zukünftigen Studien würde in der Aufklärung der durch das Fe/S-Zentrum vermittelten Funktionen des Grx3-Dimers liegen.

Summary

Glutaredoxins (Grxs) are members of the Thioredoxin (Trx)-family of proteins that maintain reduced conditions in different cellular compartments of most species, including mammalian cells.

The family of glutaredoxins can be subdivided into two groups, the monothiol Grxs (Grx3 and Grx5) with a C-G-F-S active site and the dithiol Grxs (Grx1 and Grx2) with a C-P-Y-C active site. They are located in the nucleus, cytosol, or mitochondria. Grxs are involved in numerous biological processes, for instance signal transduction. The aim of this study was to biochemically characterize the recently discovered monothiol Grx3 and to identify possible functions of Grx3 *in vivo*.

Two homologous sequences of Grx3 were deposited in databases before. An *in-silico* analysis, performed in this study, identified one of these sequences as a pseudogene whereas the second sequence was identified as the coding gene. A phylogenetic analysis highlighted Grx3 as a well conserved eukaryotic protein. Localization studies identified Grx3 as an ubiquitously expressed cytosolic and nuclear protein.

During the last years some Grxs were identified as Fe/S-cluster containing proteins. Here, we have demonstrated the coordination of Fe/S-clusters in human and murine Grx3 for the first time. Indeed, in a biochemical analysis Grx3 could be characterized as a 2[2Fe-2S]-cluster containing protein *in vitro* and *in vivo*. This Fe/S-containing holo complex required the dimerization of Grx3.

During the course of this study, Grx3 functions were described in the protection from cardiac hypertrophy and the activation of immune cells. This thesis revealed additional functions of Grx3 in the cell: A differential gene-expression analysis following stimulation with a phorbol ester pointed to possible functions in the regulation of cytoskeletal dynamics and this was supported by our finding that HeLa-cells migrated faster in the absence of Grx3. We have detected Grx3, as the only protein of the Trx family, differentially expressed in the germinal centers of the lymphatic node and in the T-cell-zone of the spleen, confirming potential functions of Grx3 in immune cell activation. The strongest effect following Grx3 depletion, however, was seen in the distribution of iron in the cell. The silencing of Grx3 expression by

siRNA resulted in strong defects in the delivery of iron to proteins and a phenotype resembling for iron-depletion, despite of normal cellular iron levels. These results might close a gap in the so far least understood process of the cellular iron metabolism - the distribution of iron from the „free“ iron pool to proteins. One central point in these future studies will have to be the analysis whether and how these functions depend on the Fe/S-clusters complexed by the Grx3 dimer.

Abkürzungen

Aft1	<i>Activator of ferric transcription</i>
AP-1	<i>Activator Protein 1</i>
BSA	Rinderserumalbumin
cDNS	komplementäre Desoxynukleinsäure
CnBr	Cyanogenbromid
DFO	Deferoxamin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Fe/S	Eisen/Schwefel
FBS	Fötales Kälberserum
FUR	<i>Ferric Uptake Regulator</i>
Grx	Glutaredoxin
GSH	Glutathion
GSNO	S-Nitrosoglutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
H	Wasserstoff
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny-ethansulfonsäure
h.p.f.	<i>hours post fertilization</i>
HRP	Horseradish Peroxidase
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	immobilisierter pH Gradient

kDa	kilo (10 ³) Dalton
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minuten
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
mRNS	Boten RNS
NADP	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NEM	N-Ethylmaleinimid
NF1	Nuclear Factor 1
NP-40	Nonidet-40
OD	optische Dichte
PBS	Phosphatpuffer-Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pI	isoelektrischer Punkt
PKC	Proteinkinase C
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNR	Ribonukleotide Reductase
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
sek	Sekunde
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOD	Superoxid-Dismutase
SRF	<i>Serum Responsive Factor</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxin Reduktase
U	Unit
upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierter Bereich

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	III
Abkürzungen	V
1 Einleitung	1
1.1 Die Thioredoxinfamilie	1
1.1.1 Das Thioredoxinsystem	3
1.1.2 Das Glutaredoxinsystem	4
1.1.3 Proteine mit einer Thioredoxin-Homologiedomäne	5
1.1.3.1 Glutaredoxin 3	6
1.2 Funktionen und Zielprozesse von Thioredoxinen und verwandten Proteinen .	8
1.2.1 Eisenschwefelzentren und Eisenregulation	8
1.2.1.1 Assemblierung von Eisenschwefelzentren	8
1.2.1.2 Eisenhomöostase	9
1.3 Zielsetzung	11
2 Material und Methoden	13
2.1 Allgemeines	13
2.1.1 Geräte	13
2.1.2 Chemikalien, Kits und andere Komponenten	14
2.1.3 Antikörper	14
2.1.4 Oligonukleotide, siRNA und Morpholinos	15
2.2 Kultivierung von Organismen	18
2.2.1 Bakterien	18
2.2.1.1 Bakterienstämme	18
2.2.1.2 Kultivierung von Bakterien	19

2.2.1.3	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien . . .	20
2.2.1.4	Proteinexpression	21
2.2.2	Zellkulturmethoden	22
2.2.2.1	Zelllinien	22
2.2.2.2	Mediumwechsel und Passagieren von Zellen	22
2.2.2.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	23
2.2.2.4	Bestimmung der totalen Zellzahl	23
2.2.2.5	Transfektion von Zellen mittels Elektroporation	23
2.2.2.6	Ernten und Lysieren von Zellen	24
2.2.2.7	Fraktionierung von Zellen	24
2.2.2.8	Migrationsassay	24
2.2.3	Zebrafische	25
2.2.3.1	Haltung von Zebrafischen	25
2.2.4	Injektion von Morpholinos	25
2.2.5	Molekularbiologie	25
2.2.5.1	Standardtechniken	25
2.2.5.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
2.2.5.3	Ortsgerichtete Mutagenese	26
2.2.5.4	DNS-Sequenzierung	26
2.2.5.5	Microarrayanalyse	26
2.2.6	Proteinbiochemie	27
2.2.6.1	Proteinreinigung	27
2.2.6.2	Antikörperproduktion und Antikörperreinigung	28
2.2.6.3	Eindimensionale SDS-PAGE	29
2.2.6.4	Westernblot	29
2.2.6.5	Experimentelle Bestimmung des apparenten Molekulargewichts von Proteinen	30
2.2.6.6	Proteinkonzentrationsbestimmung	31
2.2.6.7	Immunopräzipitation	31
2.2.6.8	Co-Immunopräzipitation von Proteinen	32
2.2.6.9	Co-Immunopräzipitation von ^{55}Fe mit Grx3	32
2.2.6.10	Kopplung von Transferrin mit ^{55}Fe	32
2.2.6.11	Bestimmung des Eisengehaltes	32
2.2.6.12	Bestimmung des Sulfidgehaltes	33
2.2.7	Spektroskopie	33
2.2.7.1	Absorptionsspektroskopie	33

2.2.7.2	Mößbauerspektroskopie	33
2.2.7.3	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie	34
2.2.8	Mikroskopie	34
2.2.8.1	Konfokale Mikroskopie	34
2.2.8.2	Immunocytochemie	34
2.2.8.3	Färbung von Zellorganellen	35
2.2.8.4	Aktinfärbung	35
2.2.8.5	Immunohistochemie	35
2.2.9	Aktivitätstests	37
2.2.9.1	Rekonstitution von Fe/S-Zentren in monothiol Glutaredoxinen	37
2.2.9.2	Bestimmung von Enzymaktivitäten	37
2.2.9.3	Bestimmung der Bindekapazität von IRP	37
2.2.10	Computer basierte Arbeiten	38
2.2.10.1	Analyse von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen	38
2.2.10.2	Abbildungen	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Charakterisierung von Grx3	39
3.1.1	Identifikation von humanem Grx3	39
3.1.1.1	Phylogenetische Verwandtschaft von Grx3 verschiedener Spezies	40
3.1.1.2	Klonierung und rekombinante Expression von Grx3	41
3.1.1.3	Produktion und Evaluation Grx3 spezifischer Antikörper . .	42
3.1.1.4	Abschalten der Grx3-Expression durch siRNA Transfektion .	43
3.1.2	Expression und Lokalisation von Grx3 in Vertebraten	44
3.1.2.1	Expression im Menschen	44
3.1.2.2	Expression und Lokalisation in Mausorganen	45
3.1.2.3	Subzelluläre Lokalisation in HeLa-Zellen	51
3.1.3	Glutaredoxin 3 besitzt einen Cofaktor	52
3.1.3.1	Koordination eines Eisenschwefelzentrums	52
3.1.4	Quantifizierung der Eisenschwefelzentren	54
3.1.5	Stabilität des Holo-Grx3-Komplexes	55
3.1.6	<i>In vivo</i> Koordination des Eisenschwefelzentrums	56
3.2	Funktionen von Grx3 in vivo	57
3.2.1	Eine Depletion von Grx3 führt zu Veränderungen der Genexpression .	57
3.2.2	Eine Depletion von Grx3 führt zu Änderungen im Zytoskelett	58

3.2.3	Eine Depletion von Grx3 führt zu Änderungen einer differentiellen Expression von Genen inflammatorischer Reaktionen	62
3.2.4	Einfluss von Grx3 in Prozessen der Eisenregulation und der Eisenhomöostase	64
4	Diskussion	71
4.1	Grx3 koordiniert einen Kofaktor	71
4.2	Lokalisation von Grx3	73
4.3	Proteine der Thioredoxinfamilie in Krankheitsprozessen	75
4.3.1	Grx3 nimmt Einfluss auf verschiedene Elemente des Zytoskeletts und auf die Hypertrophie des Herzens	75
4.3.2	Grx3 ist an inflammatorischen Reaktionen beteiligt	78
4.3.3	Grx3 ist an der Verteilung von Fe/S-Zentren im Zytosol beteiligt . . .	81
4.3.4	Ausblick	83
	Literatur	105
	Anhang	111

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Die Thioredoxinfamilie

Redoxzustände von Protein-Cystein-Thiolen werden durch Proteine der Thioredoxin (Trx)-Familie reguliert [1–4].

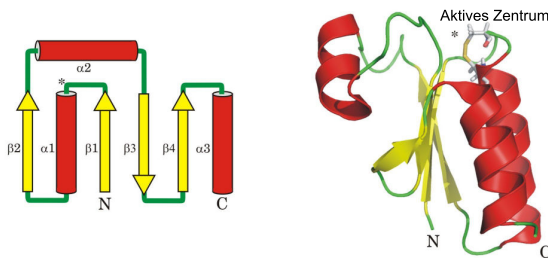


Abbildung 1.1: **Trx-Strukturmotiv.** Schematische Darstellung des Trx-Motifs. Vier zentral gelegene α -Helices sind von drei β -Faltblattstrukturen umgeben. Links: Quartärstruktur von Grx1. Rechts: Struktur von oxidiertem *E.coli* Grx1. Das Sternchen kennzeichnet die Lage des aktiven Zentrums (modifiziert nach [5]).

Eine der prägnantesten Gemeinsamkeiten aller Proteine der Trx-Familie ist ihr Strukturmotiv, das sich aus vier β -Faltblattstrukturen, die von drei bis fünf α -Helices umgeben sind, zusammensetzt (Abbildung 1.1) [6–8]. Die einfachste Form ist nur im bakteriellen Glutaredoxin 1 (Grx1) zu finden [9]; alle weiteren Trx'e oder Grx'e weisen zusätzliche Strukturelemente auf [8].

Zur Familie der Proteine mit einem Trx-Motif gehören: Grx [10], Trx [6], Peroxiredoxin (Prx) [11], Glutathion-S-Transferase (GST) [12], DsbA [13], Glutathion (GSH) Peroxidase [14], Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) [15, 16] oder intrazelluläre Chloridkanäle (CLIC) [17]. Zieht man eine zykli-

sche Permutation der Struktur in Betracht, kann auch Tubulin zu den Proteinen mit einem Trx-Motif gezählt werden [18].

Alle redoxaktiven Proteine der Trx-Familie haben ein aktives Zentrum (C-X-X-C) am Anfang der ersten α -Helix und ein cis-Prolin im dritten β -Strang [8, 19]. Variationen des aktiven Zentrums liegen beispielsweise in Form von S-X-X-C, T-X-X-C, C-X-X-X-C oder C-X-X-

S vor [20, 21]. Die Veränderungen führen zu Unterschieden in der Aktivität der Proteine, wobei die beiden zentralen Aminosäuren, X-X, und ihre Umgebung eine entscheidende Rolle einnehmen [22, 23]. Für die Bildung von gemischten Disulfiden zwischen Proteinthiolen und GSH (Glutathionylierung) von Zielproteinen durch Grx'e gibt es in der Zelle zwei unterschiedliche aber funktionell verwandte Mechanismen, den Dithiol- und den Monothiol-Mechanismus [24–31]. In beide Mechanismen werden Proteine mittels GSH reduziert. In der Zelle liegt GSH in millimolaren Konzentrationen vor und ist ein Puffer des zellulären Redoxzustandes oder ein Antioxidanz [32]. Im Folgenden ist der Reaktionsmechanismus ausschließlich für Grx beschrieben.

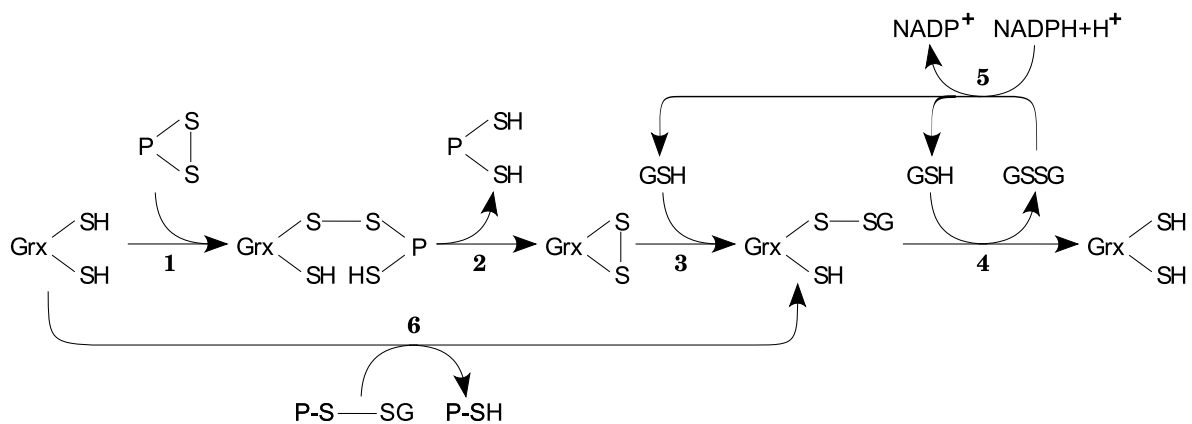


Abbildung 1.2: **Reaktionsmechanismus.** Dithiol- und Monothiol-Mechanismus. 1 – 4: Reversible Reduktion von Proteinindisulfiden über beide Cysteine im aktiven Zentrum (dithiol). 6 + 4: Reduktion von Disulfiden zwischen GSH und Grx mit dem N-terminalen Cystein im aktiven Zentrum (monothiol). 5: In beiden Fällen wird das GSH-Disulfid (GSSG) auf Kosten von einem NADPH+H⁺ durch die Glutathionreduktase (GR) reduziert (modifiziert nach [33]).

Im ersten Schritt des Dithiol-Mechanismus greift das N-terminal gelegene Cystein im aktiven Zentrum von Grx ein Disulfid im Zielprotein an. Das gemischte Disulfid-Intermediat wird durch das zweite Thiol des aktiven Zentrums angegriffen, woraus eine Disulfidbindung im aktiven Zentrum von Grx sowie ein reduziertes Protein entsteht. Das Grx wird durch ein GSH-Molekül reduziert. Als Produkt entsteht ein Intermediat aus einem Grx mit einem am N-terminalen Cystein gebundenen GSH-Molekül. Das zweite GSH-Molekül wird zur Reduktion des gemischten Disulfids zwischen Grx und GSH benötigt. Als Produkt dieser Reaktion entsteht ein reduziertes Grx mit zwei Thiolgruppen [26]; GSSG wird NADPH-abhängig von der GR reduziert.

Der Monothiol-Mechanismus ist *de facto* eine Verkürzung des Dithiol-Mechanismus, bei dem ausschließlich das N-terminale Cystein benötigt wird. Durch ein Grx-Molekül wird ein gluta-

thionyliertes Protein auf Kosten von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ mittels GSH reduziert [26, 30, 34] (Abbildung 1.2). Hieraus lassen sich drei entscheidende Schritte für eine Bindung von GSH an Grx ermitteln: (1) Bildung eines gemischten Disulfid-Intermediats mit dem N-terminalen Cystein des aktiven Zentrums nach einem nukleophilen Angriff. (2) Freisetzung des gemischten Disulfid-Intermediats durch einen nukleophilen Angriff eines weiteren GSH-Moleküls. (3) Ausbildung von nicht-kovalenten Bindungen zwischen GSH mit den Thiolgruppen beider N-terminaler Cysteine des aktiven Zentrums [35].

1.1.1 Das Thioredoxinsystem

Das Thioredoxinsystem besteht aus Trx, Trx-Reduktase (TrxR) und $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Es ist eines der antioxidativ aktivsten Systeme im Intrazellulärraum der Zelle [19]. Peter Reichard et al. beschrieben erstmals das niedermolekulare Dithiol-Protein Trx (9–16 kDa) als Wasserstoffdonator der Ribonukleotidreduktase (RNR) von *E. coli* [36, 37]. Seitdem wurde die Funktion von Trx auf eine generell wirkende Funktion als Disulfidreduktase erweitert [24, 38–42]. Aktuell ist Trx ein Protein mit Funktionen in der Beseitigung von oxidativem Stress, Regulation von Transkriptionsfaktoren sowie der Modulation von Signalkaskaden oder der Immunantwort [43–46] (für eine detaillierte Beschreibung siehe [5]).

Das ursprünglich entdeckte Protein enthält das für Dithiol-Trx typische aktive Zentrum, C-G-P-C [47], das in allen Bereichen des Lebens, vom Bakterium bis zum Menschen, konserviert ist [48].

In Säugetieren ist Trx1 ein zytosolisches Protein. Es wird bei der Stimulation, z. B. bei leichtem oxidativen Stress, sekretiert oder durch einen noch nicht bekannten Mechanismus in den Kern transloziert [49, 50]. Interessanterweise haben zytosolisches und nukleäres Trx1 unterschiedliche Redoxzustände und werden unabhängig voneinander reguliert [51]. In den vergangenen Jahren wurden bereits zahlreiche Interaktionspartner von Trx1 identifiziert, wobei der genaue Bindemechanismus noch unbekannt ist. Ein Interaktionspartner von Trx ist die *Apoptosis signal-regulating kinase 1* (ASK-1), die an reduziertes Trx1 bindet. Durch die Bindung wird die Aktivität der ASK-1 herabgesetzt und die ASK-1-abhängige Apoptose inhibiert [52]. Folglich wird Trx1 eine Funktion in der Redoxregulation der Apoptose zugeschrieben. Eine Oxidation von Trx1 führt zu einer Dissoziation von Trx1 und ASK-1, wodurch diese MAP-Kinase-Kinase-Kinase aktiviert wird [53].

Trx-Bindeprotein-2 (TBP-2), auch bekannt als Vitamin D3 hochreguliertes Protein-1 (VDUP-1) oder *Trx interacting protein* (Txnip) ist ein negativer Regulator von Trx1, der über seine Bindung an Trx1 dessen Aktivität reguliert. Eine Bestätigung der Bindung kann in einem *Yeast-Two-Hybrid Screen* gefunden werden [54–56]. Bei Bindung von Txnip an Trx1 kann Trx1 keine Interaktion mit ASK-1 eingehen, wodurch die Suppression der c-Jun N-terminalen

Kinase (JNK) aufgehoben wird [55] und stressinduzierte Signalkaskaden weiter aktiv sind. Trx2 ist ein mitochondriales Protein, das Funktionen in der Embryogenese und in aktiv atmenenden Zellen übernimmt [57].

Die genannten Trx'e bilden zusammen mit TrxR1 und TrxR2 ein reduzierendes System für Disulfide. TrxR'en bilden Homodimere, in denen beide Proteine ein FAD-Molekül und als aktives Zentrum ein Cystein-Selenocysteinmotif enthalten. Weiterhin verfügen beide Proteine über ein redoxaktives Disulfid. Als Substrate dienen unter anderem Trx, Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) [58], 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) [59] oder S-Nitrosoglutathion (GSNO) [60]. Eine Reduktion von Substraten erfolgt analog zu den oben beschriebenen Dithiol- und Monothiol-Mechanismen [61].

1.1.2 Das Glutaredoxinsystem

Komponenten des Grx-Systems sind das GSH-Redox Paar GSH/GSSG, GR und Grx [24, 62, 63].

Grx'e sind ubiquitär exprimierte niedermolekulare GSH-abhängige Reduktasen (9-16 kDa), die ebenfalls Wasserstoffdonatoren für die Ribonukleotidreduktase (RNR) sind [24, 64–68].

Eine signifikante Homologie zwischen Trx und Grx, die sich in einem gemeinsamen Faltungsmotif (Trx-Faltung) widerspiegelt, lässt auf eine funktionelle Verwandtschaft schließen. Tatsächlich kompensieren sich beide Proteinsysteme in zahlreichen Funktionen gegenseitig, aber sie ersetzen sich nicht vollständig. Aufgrund der Struktur ihres aktiven Zentrums lassen sich Grx'e in zwei Gruppen unterteilen: Dithiol-Grx'e mit zwei Cysteinen (C-P-Y-C) in ihrem aktiven Zentrum und Monothiol-Grx'e mit einem Cystein (C-G-F-S) im aktiven Zentrum. Monothiol Grx'e unterteilen sich in Einzel- und Multidomänenproteine [69–71].

Grx1 ist ein zumeist zytoplasmatisches Dithiol-Grx (C-P-Y-C), das auf bestimmte Stimuli in den Kern [72] oder den Intermembranraum von Mitochondrien [73] transloziert wird. Auch eine Sekretion von Grx1 ist möglich, wodurch es beispielsweise eine Funktion in der HIV Virion-Zell-Interaktion übernehmen könnte [74, 75]. In der Zelle ist Grx1 unter anderem an der zellulären Differenzierung [76], der Regulation von Transkriptionsfaktoren (beispielsweise AP-1 oder NF- κ B [77–79]), der Reduktion von Dehydroaskorbat [80] oder der Apoptose [81, 82] beteiligt.

Grx2 ist ein mitochondriales Dithiol-Grx (C-S-Y-C). Es weist im Vergleich zu Grx1 ein etwa 20-fach niedrigeres endogenes Proteinlevel auf [74]. In der Zelle ist Grx2 ein effizienter Katalysator von Proteinglutathionylierungen. Ein Beispiel hierfür ist die reversible Glutathionylierung von Komplex I, der größten Quelle für reaktive Sauerstoffspezies (ROS) im Organismus [83, 84]. Hierbei wird das aktive Zentrum durch GSH bzw. TrxR reduziert [85]. In HeLa-Zellen wurde gezeigt, dass Grx2 Zellen vor Doxorubicin (DOX) oder Phenylarsinoxid

(PAO) induziertem oxidativen Stress schützt. So stieg nach einer Reduktion der Expression mittels siRNA die Mortalität auf Behandlungen mit Doxorubicin oder PAO an [86]. DOX ist ein Medikament in der Behandlung von Krebs. Es interkaliert in die DNS und induziert außerdem die Produktion von ROS [87,88], indem es Elektronen von Komplex I der mitochondrialen Atmungskette nutzt [89]. PAO interagiert mit benachbarten Dithiolen und darüber mit dem Trx- und Grx-System [90]. Weiter wurde Grx2 als erstes Fe/S-Zentrum koordinierendes Grx beschrieben. Durch sein redoxsensitives Fe/S-Zentrum bildet Grx2 ein Homodimer, das *in vivo* einen Redoxsensor darstellen könnte [91].

Das erstmals in Hefe beschriebene Grx5 [92] ist ein mitochondriales Monothiol-Grx mit einer C-G-F-S-Sequenz im aktiven Zentrum. Ein *knock-down* von Grx5 weist auf Funktionen in der Biosynthese von Fe/S-Zentren hin [93].

Grx3 ist ein zytosolisches multidomänen Monothiol-Grx, das sich aus einer Trx- und zwei Grx-Domänen zusammensetzt. Witte und Mitarbeiter beschrieben Grx3 erstmals als Interaktionspartner der Proteinkinase C (PKC) [94]. In Abschnitt 1.1.3.1 ist eine detaillierte Beschreibung dieses Proteins zu finden.

GSH/GSSG stellen das bedeutenste Redoxpaar in der Zelle dar. Für die Reduktion eines GSSG Moleküls werden zwei Elektronen benötigt. Das Verhältnis von GSH zu GSSG ist ein Indikator für das zelluläre Redoxpotential. Anhand des Redoxpotentials wird der biologische Status der Zelle abgelesen (-240 mV Proliferation, -200 mV Differenzierung und -170 mV Apoptose) [95]. Die Glutathionylierung ist ein Schlüsselprozess in der Regulation von zellulären Prozessen bei oxidativem Stress, der durch Grx katalysiert wird [27, 96]. Eine durch oxidativen Stress induzierte Glutathionylierung beeinflusst hierbei die Funktionen von Proteinen wie z. B. Aktin [97], G3PDH [98], c-Jun [99] oder der NF κ -B Untereinheit p50 [100].

1.1.3 Proteine mit einer Thioredoxin-Homologiedomäne

Eine dritte Gruppe von Proteinen der Trx-Superfamilie ist über eine zusätzliche Trx-Homologiedomäne gekennzeichnet. Vertreter dieser Gruppe sind Redoxine ohne eine Oxidoreduktaseaktivität. Zu ihnen zählen die Spermatozyten/Spermatiden spezifischen SpTrx1, SpTrx2 und SpTrx3 [101,102]. SpTrx1 weist eine C-terminale Trx-ähnliche Domäne auf. SpTrx2 setzt sich aus einer C-terminalen Trx-Homologiedomäne und drei N-terminal gelegenen Nukleosid Diphosphat Kinase- (NDPK-) Domänen zusammen. SpTrx3 ist ein Einzeldomänenprotein bestehend aus einer Trx-ähnlichen Domäne. Ein weiteres Redoxin dieser Gruppe ist das mikrotubulispezifische Tx1-2, bestehend aus einer N-terminalen Trx-ähnlichen Domäne und einer C-terminalen NDPK-Domäne.

Ferner gehören zu den Proteinen mit einer Trx-Homologiedomäne Redoxine, die eine Oxidoreduktaseaktivität aufweisen. Hierzu zählt ein Substrat der TrxR, Tx1-1, bestehend aus einer

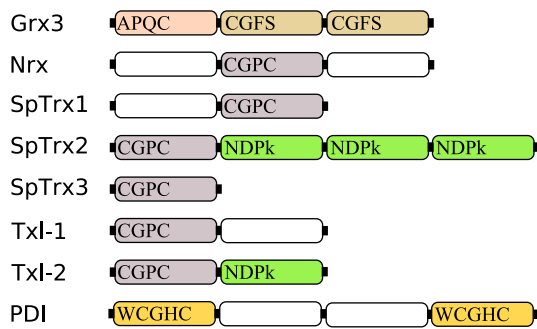


Abbildung 1.3: **Multidomänenstruktur von Proteinen mit einer Thioredoxindomäne.** Homologe Domänen sind mit gleichen Farben markiert.

C-terminalen Trx-Domäne und Nukleoredoxin (Nrx), das aus drei Trx-Homologiedomänen besteht (s. Abbildung 1.3). Die Lokalisation der genannten Proteine mit einem Trx-Motif ist in Abbildung 1.4 gezeigt.

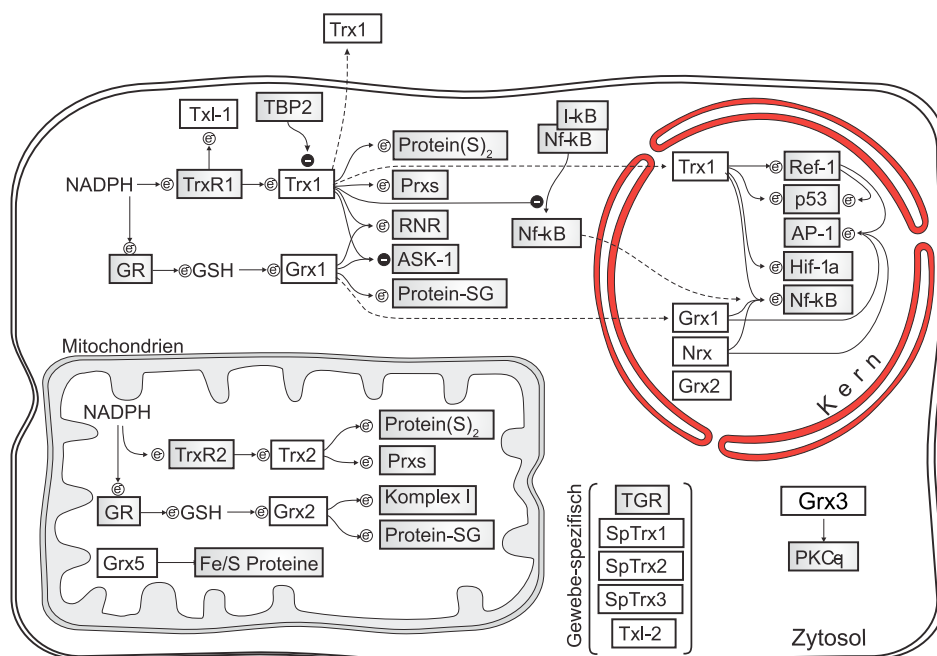


Abbildung 1.4: **Lokalisation von Proteinen mit einem Trx-Motif.** Details sind im Text beschrieben. Durchgezogene Linien deuten eine direkte Interaktion an, umkreiste (e^-) zeigen Elektronentransfer. Schwarz umrandete (-) bedeuten Inhibition, gestrichelte Pfeile stehen für eine Translokation (modifiziert nach [5]).

1.1.3.1 Glutaredoxin 3

Grx3/PICOT/TXNL2/HUSSY-22 [94, 103] ist ein aus drei Domänen aufgebautes Protein, bestehend aus einer C-terminalen Trx- und zwei N-terminal gelegenen Monothiol-Grx-

Domänen. In einem *Yeast-Two-Hybrid-Screen* und durch eine Co-Immunopräzipitation nach Überexpression wurde Grx3 als direkter Interaktionspartner der Proteinkinase C- θ (PKC θ) identifiziert. Eine Überexpression von Grx3 in T-Lymphozyten führt zu einer Aktivierung der c-Jun-terminalen Kinase sowie zu einer Inhibierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B [94]. Eine weitere Studie deutete eine Tyrosinphosphorylierung von Grx3 nach Behandlung von Jurkatzellen mit H₂O₂ an. Es wird vermutet, dass dieser Effekt Teil der aktivierungsabhängigen Signalwege der zellulären Antwort auf Stresssignale ist [104].

Darüberhinaus wurde Grx3 bei einem Chromatin-Immunopräzipitationsassay als Zielprotein von *Serum Response Faktoren* (SRF) identifiziert und in Zusammenhang mit der Entwicklung des Herzens gebracht. SRFs sind Transkriptionsfaktoren. Sie spielen in der Entstehung mesodermalen Gewebes und folglich in der Herzentwicklung eine wichtige Rolle. Hieraus lässt sich eine Relevanz von Grx3 in der frühen embryonalen Entwicklung von Herzgeweben ableiten [105]. In weiteren Studien wird Grx3 eine schützende Funktion in der Herzphysiologie zugeschrieben. Nach mechanischer (transverser Aortenverengung) oder chemischer (durch Gabe von Entholin-1 oder Phenylephrin) Induktion einer Hypertrophie steigt die Expressionsrate von Grx3 in Kardiomyozyten [106].

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Grx3 direkt mit dem Muskel-LIM Protein (MLP) interagiert [107]. MLP ist ein Schlüsselprotein für das Calcineurin-NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*)-Signaling. Tatsächlich wirkt sich Grx3 negativ auf das Calcineurin-NFAT-Signaling aus [108].

Neben dem Einfluss auf die Herzhypertrophie wirkt sich ein exakt reguliertes Grx3-Level auf die Kontraktilität von Kardiomyozyten aus. Dies lässt sich auf eine erhöhte Kalzium-Sensitivität der kontraktilen Elemente zurückführen, unter anderem hervorgerufen durch Hyperphosphorylierung von Troponin 1 oder eine Erhöhung der Sarkoplasmatischen Retikulum Kalzium ATPase (SERCA)-Aktivität. Alle genannten Prozesse sind zellautonom reguliert, eine Stimulation der Hypertrophie in isolierten Kardiomyozyten führt zu einer Erhöhung des Grx3-Expressionslevels, die in Fibroblasten nicht nachweisbar ist. Eine weitere Funktion von Grx3 deutet sich in der Embryogenese an. Homozygote Grx3^{-/-}-Mäuse weisen eine embryonale Letalität zwischen E12,5 und E14,5 auf. Charakteristisch für diese Tiere ist eine verkleinerte Körpergröße und Blutungen im Kopf. Eine histologische Analyse von E12,5 Grx3^{-/-}-Embryonen zeigt jedoch keine signifikanten Defekte in der Organogenese [109].

1.2 Funktionen und Zielprozesse von Thioredoxinen und verwandten Proteinen

1.2.1 Eisenschwefelzentren und Eisenregulation

Eisenschwefelproteine (Fe/S-Proteine) werden ubiquitär in allen lebenden Organismen exprimiert. *In vivo* koordinieren diese Metalloproteine hauptsächlich [2Fe-2S]- oder [4Fe-4S]-Zentren, die ein Redoxpotential zwischen -650 und $+450$ mV aufweisen können [110]. Hierdurch wird eine Basis für eine Vielzahl von Funktionen geschaffen (siehe Abbildung 1.5).

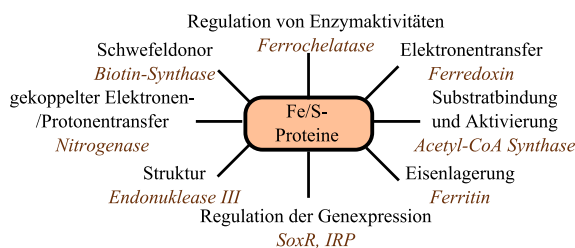


Abbildung 1.5: **Funktionen von Fe/S-Proteinen.** Gezeigt sind die Funktionen von Proteinen der Trx-Superfamilie. Für jede Funktion wurde exemplarisch ein Protein erwähnt.

1.2.1.1 Assemblierung von Eisenschwefelzentren

Eisenschwefel-(Fe/S)-Zentren können sich in Anwesenheit von anorganischem Schwefel und Eisen spontan bilden. Die hierfür benötigten Konzentrationen der beiden Elemente sind für die Zelle allerdings toxisch und die Reaktion wäre zu langsam.

Zur Beschleunigung der Reaktion und um geringe Eisen- und Schwefelkonzentrationen nutzen zu können, entwickelten sich drei verschiedene Systeme: das NIF (*nitrogen fixation*)-, das ISC (*iron-sulfur-cluster*)- und das SUF (*sulfur mobilization*)-System (für eine detaillierte Beschreibung siehe [111–113]). Prokaryonten besitzen alle drei Systeme, wobei das NIF-System Proteine der Stickstofffixierung mit Fe/S-Zentren versorgt. Das SUF-System versorgt Proteine unter Eisenmangel oder oxidativem Stress in Bakterien und Archaeabakterien mit Fe/S-Zentren und das ISC-System ist das wichtigste System für die Reifung von Fe/S-Zentren. In Eukaryonten ist sowohl das ISC-System in Mitochondrien als auch das SUF-System in Plastiden von photosynthetisch aktiven Organismen exprimiert [111, 114, 115].

Im Weiteren wird das ISC-System näher betrachtet. Das ISC-Operon von Bakterien besteht aus IscS, IscU, dem Ferredoxin IscA und den beiden Chaperonen HscA und HscB [116, 117]. In diesem System übernehmen IscS und IscU die Funktion der Cystein-Desulfurase [117, 118] bzw. der Fe/S-Assemblierungsplattform [119, 120]. Aufgrund ihrer strukturellen Unterschiede scheinen IscA und IscU unterschiedliche Apo-Proteine mit Fe/S-Zentren zu versorgen [121, 122]. Durch die Aktivitäten des ISC-Exports und der CIA-Maschinerie (*cytosolic iron-sulfur protein assembly*) wurde die Präsenz von Fe/S-Proteinen in Zytosol, Mitochondrien und Nukleus

geklärt [123].

Für die Synthese von Fe/S-Zentren in Proteinen stellen alle Systeme eine Pyridoxalphosphat-abhängige Cysteindesulfurase und eine Assemblierungsplattform für Fe/S-Zentren zur Verfügung. Bisher konnte die Funktion der Cystein-Desulfurase eindeutig den Proteinen NifS, SufS und IscS zugesprochen werden [111,124,125]. Im Gegensatz dazu ist die Übertragung der Fe/S-Zentren von Nif/IscU oder SufA auf apo-Fe/S-Proteine noch unklar [113,126]. Für Grx5 wird eine Funktion als *Scaffold*-Protein diskutiert. Ein *knock-out* von Grx5 führt zu einem konstitutiven oxidativen Schaden, einer Inaktivierung von Fe/S-Proteinen und Eisenakkumulationen, da Isu1 Fe/S-Zentren bindet und diese nicht auf Zielproteine mittels Ssq1 oder Atm1 überträgt [127]. Eine Verminderung dieser Effekte kann durch die Überexpression von Ssq1, einem HSP70/DnaK-Typ-Chaperon oder von Isa herbeigeführt werden [93]. Ferner geht Grx5 Komplexe mit Hefe ISC-Komponenten ein [128]. In einem *Yeast-Two-Hybrid-Screen* wurde Grx5 als Interaktionspartner von IsaI identifiziert [129].

1.2.1.2 Eisenhomöostase

Eisen ist für alle Organismen essentiell, aber in zu hohen Dosen toxisch. Um Fehlfunktionen zu vermeiden, ist eine exakte Regulation des Eisengehalts unerlässlich. Bisher zeichnet sich hier eine besondere Funktion der Monothiol-Grx'e in der Eisenhomöostase ab. In der Zebrafisch (*Danio rerio*) Mutante *Shiraz* führt ein Grx5 *knock-down* zu einem Ungleichgewicht in der Biosynthese von Fe/S-Zentren und als Folgereaktion zu Defekten in der Eisenhomöostase und der Hämsynthese [70]. Patienten mit einem Splicing-Defekt im Grx5-Gen, der zu verminderten Grx5-Leveln führt, weisen eine sideroblastische-mikrozystische Anämie und ein deutlich erhöhtes Eisenlevel auf [130].

Der oben beschriebene Grx5-Phänotyp in Hefe kann durch die Expression verschiedener Monothiol-Grx'e mit mitochondrialer Lokalisation aufgehoben werden [69, 70, 131].

Bakterien (z. B. *E. coli*) nehmen Eisen Fur (*ferric uptake regulator*) vermittelt auf. Mit Eisen beladen ist Fur ein Repressor für zahlreiche Gene der Eisenaufnahme und -regulation [132]. In einem Fur⁻ *E. coli* Stamm zeigt eine Eisendepletion eine Reduktion der Expression. Bei Überexpression von Grx4, einem Homolog zu humanem Grx5, erhöhte sich die Expression der betreffenden Gene. Folglich scheint Grx4 in die Eisenhomöostase involviert zu sein [133].

In *Saccharomyces cerevisiae* wird der Transport von Eisen in die Zelle durch Aft (*Activator of ferrous transport*) reguliert [134,135]. Aft ist ein zytosolisches Protein, das bei Eisenmangel in den Kern transloziert und die Transkription des Eisenregulons induziert [131]. Der genaue Mechanismus der Eisendetektion ist bis heute unklar. Bisher wird Aft in Zusammenhang mit der Biosynthese von Fe/S-Zentren und als direkter Interaktionspartner von Hefe Grx3/4 (Homologons zum humanen Grx3) beschrieben [136–138]. In Zellen ohne Grx3/4 werden Gene

des Eisenregulons konstitutiv exprimiert, wohingegen eine Überexpression von Grx4 keine Veränderungen zum Wildtyp zeigt. Ferner zeigt sich, dass Zellen ohne Grx3/4 in der G1-Phase des Zellzyklus verbleiben, und dadurch langsamer wachsen. Dies wird als Konsequenz der Dysregulation des Eisenstoffwechsels interpretiert. Außerdem sind die Zellen sensibler gegenüber oxidativem Stress, der durch Wasserstoffperoxid oder tert-butyl Hydroperoxid ausgelöst wird. Eine Behandlung mit Diamid, einem Oxidant für Thiole, hat hingegen keinen Effekt [138].

Vertebraten haben ein posttranskriptionelles System zur Regulation der Eisenaufnahme bzw. zur Eisenkofaktor Biosynthese [139–141]. Das System basiert auf den eisenregulierten Proteinen IRP1 und IRP2 (*iron regulatory protein*). Unter Eisenmangel können diese Proteine an IREs (*iron responsive elements*), *Hairpin*-Strukturen in der mRNA von IRP regulierten Genen, binden. IREs befinden sich entweder am 5'- oder am 3'-UTR der mRNA. Eine Bindung am 5'-UTR führt zu einer Repression der Translation, wie es zum Beispiel für Ferritin der Fall ist. Die alternative Bindung am 3'-UTR, zum Beispiel bei dem Transferrinrezeptor (TfR), führt zu einer Stabilisierung der mRNA und so zu einer erhöhten Translationsrate [139]. In *Danio rerio* konnte gezeigt werden, dass eine fehlende Expression von Grx5 zu einer Aktivierung von IRP1 führt [70]. Es wird angenommen, dass die Eisenregulation im Menschen eine wichtige Rolle in zahlreichen Erkrankungen wie beispielsweise Morbus Alzheimer [142, 143], Morbus Parkinson [144] oder Friedreich-Ataxie [145, 146] spielt.

1.3 Zielsetzung

Zu den Zielen der vorliegenden Dissertation gehörten Untersuchungen zur Identifikation, Lokalisation und Funktion von humanem Grx3.

Im ersten Schritt sollte eine *in silico* Analyse durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Analyse sollten Sequenzeigenschaften des Grx3-Gens und die phylogenetische Verwandtschaft von Grx3 verschiedener Spezies untersucht werden.

Im zweiten Schritt sollten durch eine *in vitro* Analyse die biochemischen Eigenschaften von Grx3 geklärt werden. In der Vergangenheit konnten Fe/S-Zentren in Zusammenhang mit Grx'en gebracht werden. Im Rahmen der biochemischen Analyse sollte nach *in vitro* Rekonstitution oder anaerober Reinigung geklärt werden, ob das monothiol Grx3 Fe/S-Zentren koordinieren kann. In einem weiteren Schritt sollte der Einfluss äußerer Faktoren auf die Stabilität der Fe/S-Zentren gezeigt werden. Schließlich sollten die Fe/S-Zentren im Anschluss an eine anaerob durchgeführte Immunopräzipitation ggf. auch *in vivo* nachgewiesen werden.

Im dritten Schritt sollten Erkenntnisse zu Funktionen von Grx3 *in vivo* gesammelt werden. Hierzu sollte zunächst eine Expressionsstudie mittels RT-PCR und eine Lokalisationsstudie mittels Immunohistochemie durchgeführt werden. In Kombination mit den Daten einer Microarrayanalyse nach differentieller Genexpression von Grx3 unter Stimulation mit Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) sollten mögliche Funktionen von Grx3 nach Stimulation der PKC hergeleitet werden, die in nachfolgenden Experimenten verifiziert werden sollten.

Das Hauptaugenmerk der Funktionsanalyse lag in der Analyse des Einflusses von Grx3 im Transport von Eisen in der Zelle bzw. der Übertragung von Fe/S-Zentren und sein Einfluss in der Eisenhomöostase. Hierzu sollten die Aktivitäten verschiedener eisenabhängiger Proteine, die RNS-Bindeaktivitäten von IRP1 und IRP2 sowie die Expression eisenabhängiger Proteine bestimmt werden.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Allgemeines

2.1.1 Geräte

Ausstattung			
Gerät	Firma	Stadt	Land
Agaroseelektrophoresekammer	Carl Roth	Karlsruhe	D
Autoklav	Systec	Wittenberg	D
Spannungsgeber ECPS 3000/150, EPS 600, 601	Pharmacia Fine Chemicals	Uppsala	SE
Acrylamid Elektrophorese Kammer	Invitrogen	Karlsruhe	D
Elisa Reader Infinite M200	Tecan	Crailsheim	D
Photometer V-550	Jasco	Crailsheim	D
Photometer Specord S300 UV Vis	Analytic Jena	Jena	D
Gel Imager	Kodak	Stuttgart	D
Inkubator	Heraeus	Hanau	D
Kamera Chemostar	Intas	Brüssel	D
Mikroskop LCS SP2	Leica Microsysteme	Wetzlar	D
Lichtmikroskop Leica Diaplan	Leica Microsysteme	Wetzlar	D
Mikroskop Kamera Micro Publisher	QImaging	Surrey BC	CAN
pH-Meter	G-tech Instruments	Hsinchu	T
Pipetierhilfe Matrix Cell Mate II	Thermo Scientific	Schwerte	D
Schüttelinkubator Innova 4300	New Brunswick Scientific	New Jersey	USA
Schlittenmikrotom Microm HM400	Thermo Scientific	Walldorf	D

Sterilbank Antair BSK	Cothech	Berlin	D
Thermocycler T3000	Biometra	Göttingen	D
Wasserbad Lauda m ³	Lauda Dr. R. Wobser GmbH	Lauda-Königshofen	D
Zentrifuge Avanti J-20 XP	Beckman	München	D
Fermenter R'ALF PLUS SOLO, 6, 7 L	Bioengineering	Wald	CH

2.1.2 Chemikalien, Kits und andere Komponenten

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von Acros (Geel, Bel), Applichem (Darmstadt, D), Carl-Roth (Karlsruhe, D), Fermentas (St. Leon-Rot, D), Fluka (Buchs, CH), Gibco Life Technology (Karlsruhe, D), Merck (Darmstadt, D), Riedel de Haen (Seelze, D), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D), Serva (Heidelberg, D) oder Sigma-Aldrich (Darmstadt, D) in analytischem Grad bezogen. Matrices zur Reinigung von Proteinen wurden von GE Healthcare (München, D) bezogen.

Für diese Arbeit verwendete Kits stammten von den Firmen Bio-Rad (Hercules, USA), Fermentas (St. Leon-Rot, D), Macherey-Nagel (Düren, D), Promega (Mannheim, D), Quiagen (Hilden, D), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D) und Thermo Scientific (Walldorf, D). Weitere Komponenten wie beispielsweise Antibiotika-Stocks, Enzyme, Fötales Kälberserum, Fötales Ziegenserum, Konzentratoren, Puffer, Protein- und DNA-Marker, Membranen sowie Zellkulturmedien wurden von Fermentas (St. Leon-Rot, D), Finnzymes (Espoo, FI), Invitrogen (Groningen, NL), New England Biolabs (Frankfurt, D) oder PAA (Cölbe, D) bezogen. Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, Falcontubes, Pipettenspitzen, Zellkulturflaschen oder sterile Pipetten wurden bei Carl-Roth (Karlsruhe, D), Greiner (Frickenhäusen, D), Kobe (Marburg, D) oder Sarstedt (Nümbrecht, D) bestellt.

2.1.3 Antikörper

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen in humanen Zelllinien oder Lysaten wurden entweder Antikörper aus Eigenproduktion oder kommerziell erworbene Antikörper in geeigneter Verdünnung verwendet (siehe Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: Antikörper zur Färbung von humanen Zellen oder Lysaten.

Name	Quelle	Wirt	Verdünnung
Ferritin	ICN Biomedicals	Kaninchen	1 : 1000
Goat-anti-mouse biotin	Bio-Rad	Ziege	1 : 5000
Goat-anti-mouse HRP	Bio-Rad	Ziege	1 : 5000
Goat anti-rabbit biotin	Bio-Rad	Ziege	1 : 5000
Goat-anti-rabbit-HRP	Bio-Rad	Ziege	1 : 5000
GPAT	Bereitstellung: Dr. Hele- ne Puccio, Department of Neurobiology and Gene- tics, Illkirch, FR	Kaninchen	1 : 7500
hGrx3	eigene Herstellung	Kaninchen	1 : 1000
hGrx5	eigene Herstellung	Kaninchen	1 : 1000
Iron responsive protein 1	eigene Herstellung	Kaninchen	1 : 1000
Iron responsive protein 2	Leihgabe AG Lill	Kaninchen	1 : 200
mGrx3	eigene Herstellung	Kaninchen	1 : 1000
Proteinkinase C θ	BD Transduction Labora- tories	Maus	1 : 1000
TfR	Zymed	Maus	1 : 3000
Tubulin T9026	Sigma (Taufkirchen, D)	Maus	1 : 5000

2.1.4 Oligonukleotide, siRNA und Morpholinos

Primer, die für diese Studie verwendet wurden, sind von DNA-Technology GmbH (Aarhus, DK) im Kundenauftrag synthetisiert worden. Versandt wurden die Oligonukleotide in lyophilisierter Form. Vor ihrer Verwendung wurden die Primer mit Nuklease-freiem Wasser auf eine Stockkonzentration von 100 pmol/ μ l eingestellt und bis zu ihrer Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert (siehe Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3: Oligonukleotide für Klonierungen und Q-RT-PCR. Nicht-Homologe Bereiche in den Sequenzen wurden fett geschrieben.

Name	Amplifikat	Sequenz
PRCHLM001	hGrx3-f	CACACACATATGGCGGGCGGGGGCGGCTG
PRHPM013	hGrx3-r	GGATCCTTAATTTTCTCCTCTCAGTATAGGCAG CAATTCACCATTTTCTTTTCAGTTCCTTCACAATAT CCAATCCTCC
PRHPM023	hGrx3- C159S-f	CTCCTCAAGAACCACGC AGTGGTTTCAGCAAGCA GATGGTGGAAATTCTTCACAAAC
PRHPM024	hGrx3- C159S-r	GTTTGTGAAGAATTTCCACCATCTGCTTGCTGAA ACCACTGCGTGGTTCTTGAGGAG
PRHPM025	hGrx3- C261S-f	CAAACAGGAAGCAAAAT CTGGATTCAGCAAACAA ATTCTGGAAATACTAAATAGTAC
PRHPM026	hGrx3- C261S-r	GTACTATTTAGTATTTCCAGAATTTGTTTGCTGA ATCCAGATTTTGCTTCCTGTTTG
PRHPM030	hGrx3-f	CAAGTCCCTCCTTGTGGTCCATTTCTGG
PRHPM033	hGrx3-r	CTTACAATAGTTGGGCACCAAGTTTAAG
PRHPM038	mGrx3-r	GGATCCCTAATTTTCTCCTTTTCAGTATAGGCA GCAATTCACCGTTGTCTTTTCAGTTCCTTGACAA TATCCAATCC
PRHPM039	mGrx3-f	CATATGGCGGGCGGGGGCGGCCG
PRHPM041	hGrx3 (1-120)-r	GGATCCTCAGGAGCCACTAGATGCATGTCGCTG
PRHPM042	hGrx3 (125-235)-f	CATATGGCTAATGAACATCTTAAAGAAGATCTC AACC
PRHPM043	hGrx3 (235-335)-f	CATATGTTAGAGGAAAGGCTCAAAGTGCTGAC
PRHPM044	hGrx3 (125-235)-r	GGATCCTCATAATTTGGGAGCTTTGGGACAAA TTGTATC
PRHPM060	Grx3-f	GATGAAGAAGTTCGGCAAGG
PRHPM061	Grx3-r	GGCAGCAATTCACCATTTTC
PRHPM062	ICAM1-f	GCTGGAGCTGTTTGAGAACAC
PRHPM063	ICAM1-r	CAAGTTGTGGGGGAGTCG

PRHPM064	Tpm2-f	GGAGAAAACCATCGATGACC
PRHPM065	Tpm2-r	CAAGGTCTGGTGAATCTCGAC
PRHPM066	Dock4-f	CAACCAGCCCGATGAGAC
PRHPM067	Dock4-r	GCTCTCTGGAATGGGAGTCA
PRHPM068	HO-1-f	CAAGTTCAAGCAGCTCTACCG
PRHPM069	HO-1-r	CCTGCAACTCCTCAAAGAGC
PRHPM070	Dusp6-f	CGACTGGAACGAGAATACG
PRHPM071	Dusp6-r	GGAGAACTCGGCTTGGAAC
PRHPM072	ITGA2-f	GAACCGAATGGGAGATGTGT
PRHPM073	ITGA2-r	CATTTGGAATGCTTGTTGAAGT
PRHPM074	Txnip-f	CTTCTGGAAGACCAGCCAAC
PRHPM075	Txnip-r	GAAGCTCAAAGCCGAACCTG
PRHPM076	GLRX-f	GGGCTTCTGGAATTTGTTCGAT
PRHPM077	GLRX-r	CTGCATCCGCCTATACAATCTT
PRHPM078	FosB-f	CTGACCGACCGACTCCAG
PRHPM079	FosB-r	GCACAAACTCCAGACGTTCC
PRHPM080	Dusp4-f	GTGCATCCCAGTGGAAGATAAC
PRHPM081	Dusp4-r	GCAGTCCTTCACGGCATC
PRHPM082	CFL2-f	CTGGGCTCCTGAAAGTGC
PRHPM083	CFL2-r	CTACATTGCCTCCCAATTTCTCTCC
PRHPM084	GAPDH-f	GAGTCCACTGGCGTCTTCAC
PRHPM085	GAPDH-r	GTTCACACCCATGACGAACAT

Morpholinos wurden von Gene Tools, LLC (Philomath, USA) bezogen (siehe Tabelle 2.4).

Tabelle 2.4: Morpholinos zur Injektion in *D. rerio*.

Name	Sequenz
Grx3	ATGCCGCGTCCGTGAAGTTCGCCAT
Kontrolle	<i>Standard control Oligo</i> (Gene Tools, LLC (Philomath, USA))

Die siRNA wurde von Ambion (Austin, USA) oder Eurogentec (Seraing, BE) bezogen. Versandt wurden die Proben als komplementäre doppelsträngige siRNA in gefrorener Lösung. Um wiederkehrende Auftau- und Einfrierzyklen zu vermeiden, wurde die siRNA auf Eis auf-

getaut und aliquotiert (siehe Tabelle 2.5).

Tabelle 2.5: Zur Transfektion verwendete siRNA.

Name	Sequenz
si-Grx3(TS1)-s	GCCUAUUCCAGUUGGCCUAtt
si-Grx3(TS1)-a	UAGGCCAACUGGAAUAGGCtt
si-Grx3(TS2)-s	CGAAGUUAUGGCAGAGUUtt
si-Grx3(TS2)-a	UAACUCUGCCAUAACUUCGtt
si-Grx3(TS3)-s	GGAACUCCUCAAGAACCACtt
si-Grx3(TS3)-a	GUGGUUCUUGAGGAGUUCctt
si-control-s	CAUUCACUCAGGUCAUCAAtt
si-control-a	CUGAUGACCUGAGUGAAUGAtt

2.2 Kultivierung von Organismen

2.2.1 Bakterien

2.2.1.1 Bakterienstämme

Alle Experimente mit kompetenten Bakterien des *Escherichia coli* K-12-Stammes wurden mit BL21(DE3)codonplus (Expression) und XL1blue mrf' (Klonierung) durchgeführt. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Zellen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert (siehe Tabelle 2.6).

Tabelle 2.6: Bakterienstämme für Klonierungen und Expression.

Name	Genotyp	Firma	Stadt	Land
XL1bluemrf'	$\Delta mrcA3\delta(mrcCB-hsdSMR-mrr)173endA1\ supE44\ thi-1\ recA1\ gyrA96\ relA1\ lac\ F'[proAB\ lac_qZ]\delta M15\ Tn10(Tet^r)$	Stratagene	Heidelberg	D
BL21(DE3) codonplus	E.coli B F^- ompT hsd(rB $^-$ -mB $^-$)dcm $^+$ Tet r gal λ (DE3) endA Hte[argU proL cam r][argU ileY leuW Strep/Spec r]	Stratagene	Heidelberg	D

2.2.1.2 Kultivierung von Bakterien

LB-Medium: 1% (w/v) NaCl, 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt, 1% (w/v) Trypton, pH 7,2-7,5. **Vogel-Bonner-Medium:** 25-fach **VBB-Salze:** 10,25 g $MgSO_4$, 560 g Zitrat, 319,2 g K_2HPO_4 , 87,5 g $Na(NH_4)HPO_4 \cdot 4H_2O$, mit Wasser auf einen Liter auffüllen; **SL4-Lösung:** 500 mg EDTA; 200 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; **SL6-Lösung:** 100 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 125 mg $MnCl_2$, 300 mg H_3BO_3 , 236 mg $CoSO_4 \cdot 6H_2O$, 10 mg $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 20 mg $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 30 mg $NaCuCl_2MoO_4 \cdot 2H_2O$. Für das Medium wurden die folgenden Substanzen in der angegebenen Reihenfolge miteinander vermengt: (1) 850 ml Wasser; (2) 20 g Glukose; (3) 40 ml 25x VBB-Salze; (4) 0,2 ml 100 mM Thiamin-HCl; (5) 10 ml SL-4 Lösung; (6) notwendige Antibiotika

Alle flüssigen Wachstumsmedien wurden mit doppelt destilliertem Wasser aus einer Millipore-Q-Anlage angesetzt und vor ihrer Verwendung für 20 min bei 121 °C und 1 bar autoklaviert. Alle Medien wurden bei Raumtemperatur gelagert. Zur Produktion von Festmedien wurden die Flüssigmedien mit 1,5 % Agar-Agar versetzt und nach dem Autoklavieren auf etwa 60 °C abgekühlt, um dann in Petrischalen gegossen zu werden. Nach dem Erhärten des Mediums wurden die Platten bei 4 °C gelagert.

Je nach Verwendung wurden einzelne Kolonien oder 50 µl einer Bakterienstammkultur in unterschiedlichen Volumina Medium angeimpft. Für kleine Volumina (bis 5 ml) wurden Sarstedt-Röhrchen verwendet, mittlere Volumina (bis 100 ml) wurden in Erlenmeyerkolben und große Kulturvolumina (bis 5 l) wurden in einem Fermenter angeimpft. Kleine und mittlere Kulturvolumen wurden über Nacht bei 37 °C und 250 upm in einem Horizontalschüttler inkubiert. Große Kulturvolumen wurden in einem Fermenter herangezogen und abschließend für die Expression rekombinanter Proteine verwendet.

Entsprechend [147] wurden Antibiotika Stocklösungen in autoklaviertem doppelt destilliertem Wasser oder 100 % Ethanol angesetzt und die Wachstumsmedien mit den benötigten Antibiotika in den angegebenen Endkonzentrationen verwendet (siehe Tabelle 2.7).

Tabelle 2.7: Antibiotika-Stocklösungen und Endkonzentrationen.

Name	Stocklösung [mg/ml]	Lösungsmittel	Endkonzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]
Ampicillin	100	H ₂ O	100
Chloramphenicol	34	Ethanol	34
Kanamycin	100	H ₂ O	100
Tetrazyklin	10	Ethanol	10

2.2.1.3 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

RF-1: 100 mM RbCl, 50 mM MgCl₂, 30 mM K-Acetat, 10 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerol, pH 5,8. **RF-2:** 10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerol, pH 6,8.

Chemisch kompetente Bakterien wurden nach der Rubidiumchlorid-Methode hergestellt [148]. Beim Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($\text{OD}_{600} = 0,5 - 0,7$) wurden die Bakterien für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie bei $1000 \cdot g$ für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Nachdem die Bakterien in 1/3 des Anfangsvolumen RF-1 Lösung resuspendiert wurden, schloss sich eine 15-minütige Inkubation auf Eis an. Anschließend wurden die Bakterien erneut unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1/12,5 des Anfangsvolumens RF-2 Lösung resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Abschließend wurden die Zellen aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Während der gesamten Prozedur wurden die Bakterien kühl gehalten.

Je Transformation wurden 200 μl kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und mit etwa 25 ng Plasmid-DNA (siehe Tabellen 2.8 und 2.9) oder einem Ligationsansatz vermischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien 90 Sekunden auf 42 °C erwärmt, für 5 Minuten auf Eis inkubiert und mit 800 μl LB-Medium versetzt. Dieses Gemisch wurde für 30 bis 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurden die transformierten Bakterien auf Agarplatten mit den entsprechenden Resistenzmarkern ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 2.8: Kommerziell erworbene Vektoren.

Name	Anwendung	Firma	Stadt	Land
pET15b	Expression	Novagen	Darmstadt	D
pGEMT-easy	Klonierung	Promega	Mannheim	D
pJET	Klonierung	Fermentas	St. Leon-Rot	D

Tabelle 2.9: Vektoren aus eigener Herstellung.

Name	Anwendung
hGrx3-pET15b	Expression
hGrx3 – 1 – 120-pET15b	Expression
hGrx3 – 1 – 235-pET15b	Expression
hGrx3 – 121 – 235-pET15b	Expression
hGrx3 – 121 – 335-pET15b	Expression
hGrx3 – 235 – 335-pET15b	Expression
mGrx3-pET15b	Expression

2.2.1.4 Proteinexpression

Waschpuffer: 300 mM NaCl, 25 mM NaH₂PO₄, 25 mM Na₂HPO₄, pH 8,0.

Rekombinante Proteine wurden in einem Fermenter exprimiert. Vor einer Proteinexpression wurden BL21(DE3)codonplus *E.coli*-Stämme mit den entsprechenden pET15b-Vektoren transformiert und auf Agarplatten mit den notwendigen Resistenzmarkern ausplattiert. Der Fermenter wurde mit 100 ml einer Übernachtskultur angeimpft und die Bakterien wuchsen bei 37 °C, 200 upm und pH 7,4 bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht wurde. Nach Reduktion der Temperatur auf 22 °C wurde die Expression durch Zugabe von 0,5 M IPTG induziert. Im Anschluss an eine 16-stündige Expression wurden die Zellen geerntet. Hierzu wurden die Zellen bei 5000 · g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 20 ml Waschpuffer resuspendiert und unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Proben für eine Analyse mittels Mößbauer-Spektroskopie wurden in VBB-Medium kultiviert.

Zur Expression wurde $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}^{57}(\text{SO}_4)_2$ als Eisenquelle zugegeben, welche durch Kochen des Fe^{57} in Schwefelsäure hergestellt wurde.

Zur Expression rekombinanter Proteine wurden die folgenden Bakterienstämme verwendet:

BL21(DE3)codonplus hGrx3-pET15b

BL21(DE3)codonplus hGrx3 – 1 – 120-pET15b

BL21(DE3)codonplus hGrx3 – 1 – 235-pET15b

BL21(DE3)codonplus hGrx3 – 121 – 235-pET15b

BL21(DE3)codonplus hGrx3 – 121 – 335-pET15b

BL21(DE3)codonplus hGrx3 – 235 – 335-pET15b

2.2.2 Zellkulturmethoden

2.2.2.1 Zelllinien

HeLa-Zellen

HeLa-Zellen sind humane Tumorzellen. Sie wurden 1951 aus einem Zervix-Karzinom einer 31 Jahre alten Frau isoliert. Die Zellen wachsen als epithel-ähnlicher Monolayer mit einer Verdopplungszeit von etwa 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 . Sie wurden in DMEM-Medium kultiviert, welches mit 10 % FCS und Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (0,1 mg/ml) versetzt wurde. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:10 gesplittet.

Jurkat-Zellen

Jurkat-Zellen sind humane leukämische T-Zellen, die 1976 aus dem peripheren Blut eines 14 Jahre alten Jungen mit einer akuten lymphatischen Leukämie isoliert wurden. Jurkat-Zellen wachsen als einzelne Zellen in einer Suspensionskultur mit einer Verdopplungszeit von 25 bis 35 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 . Kultiviert wurden die Zellen in RPMI-1640 Medium, welches mit 10 % FCS und Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (0,1 mg/ml) versetzt wurde. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage in einem Verhältnis von 1 zu 2 bis 1 zu 10 gesplittet.

2.2.2.2 Mediumwechsel und Passagieren von Zellen

Um schnell wachsende Zellen vor Stress-Bedingungen zu schützen, wurde das Medium alle zwei Tage gewechselt. Hierfür wurden alle benötigten Medien und PBS auf 37 °C vorgewärmt. Im Falle von HeLa-Zellen wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und neues Medium zugegeben. Im Falle von Jurkat-Zellen wurden diese bei $80 \cdot g$ für 10 min zentrifugiert und das Zellpellet anschließend in frisches Medium aufgenommen. Bei Erreichen einer Konfluenz von 80 – 90 % wurden die Zellen passagiert. HeLa-Zellen wurden hierzu einmal mit PBS gewaschen und anschließend 2 bis 5 min mit Trypsin unter Kulti-

vierungsbedingungen inkubiert. Die Reaktion wurde durch Applikation von FCS-haltigem DMEM-Medium gestoppt, die Zellen vereinzelt und in der benötigten Verdünnung ausgesät. Jurkat-Zellen wurden 5 min bei $80 \cdot g$ zentrifugiert, anschließend in 10 ml frischem RPMI-1640 Medium resuspendiert und in der benötigten Verdünnung in neuen Zellkulturflaschen ausgesät.

2.2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Nachdem konfluente Zellen entsprechend Abschnitt 2.2.2.2 mittels Trypsin (2,5 mg/ml) vom Flaschenboden gelöst wurden, wurden sie in 1 ml serumhaltigem Medium resuspendiert und in ein Kryogefäß mit 100 μ l DMSO gegeben. Diese Angaben gelten für T75 cm² Gewebekulturflaschen. Diese Mischung wurde in einem Isopropanol enthaltendem Gefäß bei -80 °C über drei Tage eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Vor ihrer Verwendung wurden die Zellen in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und schnellstmöglich in 5 ml frischem FCS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen 10 min bei $80 \cdot g$ zentrifugiert, in frischem Medium aufgenommen und unter Standardbedingungen kultiviert.

2.2.2.4 Bestimmung der totalen Zellzahl

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden 100 μ l Zellsuspension in eine Neubauerkammer gegeben und entsprechend den Angaben für Neubauerkammern gezählt.

2.2.2.5 Transfektion von Zellen mittels Elektroporation

Transfektionspuffer: 21 mM HEPES, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na₂HPO₄, 6 mM D-Glukose, pH 7,15.

Standardmäßig wurden $3,5 \cdot 10^6$ Zellen mit 15 μ g siRNA mittels Elektroporation transfiziert. Hierzu wurden HeLa-Zellen wie in Abschnitt 2.2.2.2 beschrieben trypsinisiert und je einmal mit Medium und anschließend mit PBS gewaschen. Schließlich wurde die benötigte Anzahl an Zellen in 550 μ l Transfektionspuffer aufgenommen [149], mit der zu transfizierenden Nukleinsäure versetzt und in einer Elektroporationsküvette mit 4 mm Schichtdicke bei 250 V und 1500 μ F für 25 bis 30 ms elektroporiert. Hiernach wurden die Zellen falls nötig mit 550 μ l FCS versetzt und in 20 % konditioniertem Medium ausgesät.

2.2.2.6 Ernten und Lysieren von Zellen

Lysepuffer: 10 mM Tris/HCl, 0,1 % (v/v) NP-40, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, pH 7,4.

Zum Ernten wurden die Zellen entsprechend Abschnitt 2.2.2.2 trypsinisiert, anschließend erst mit Medium und dann mit PBS gewaschen.

Bei einer Lyse der Zellen wurde das Zellpellet in Lysepuffer resuspendiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die aufgeschlossenen Zellen wurden bei -20 °C eingefroren und nach ihrer Lagerung auf Eis aufgetaut. Danach wurden die aufgeschlossenen Zellen bei 4 °C und 13000 · g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Versuche verwendet und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.2.7 Fraktionierung von Zellen

Mitopuffer: 5 mM Tris/HCl, 250 mM Sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, pH 7,4. **Digitoninpuffer:** 0,008 % Digitonin in Mitopuffer.

Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.2.6 beschrieben geerntet. Zur Lyse wurden die Zellen in eiskaltem Digitoninpuffer verdünnt bis eine Proteinkonzentration von maximal 2 mg/ml erreicht wurde und für 5 bis 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 10 min bei 15000 · g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde als zytosolische Fraktion aufgenommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Pellet wurde in einem angemessenen Volumen Mitopuffer aufgenommen und als Fraktion mit einer Mitochondrienanreicherung schockgefroren. Alle Fraktionen wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.2.8 Migrationsassay

Für die Durchführung eines Migrationsassays wurden HeLa-Zellen entsprechend Abschnitt 2.2.2.5 mit Kontroll- oder Grx3-spezifischer siRNA transfiziert. Im Anschluss an die Transfektion wurden die Zellen für 24 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert und anschließend auf eine Zellzahl von 0,5 Millionen Zellen eingestellt. Aus dieser Zellsuspension wurden 70 µl entnommen und in sterile ibidi Schalen ausgesät und erneut für 24 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert. Im Rhythmus von 4 Stunden wurden mit einem Phasenkontrastmikroskop Bilder des Spaltes aufgenommen. Zur Verhinderung einer Zellteilung wurden die HeLa-Zellen in einem Medium mit einem auf 5 % reduzierten FCS-Gehalt kultiviert. Die Auswertung dieses Assays erfolgte mit Inkscape.

2.2.3 Zebrafische

2.2.3.1 Haltung von Zebrafischen

Zebrafische wurden, wie unter http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html angegeben, gehalten.

2.2.4 Injektion von Morpholinos

Injektionspuffer: 300 mM KCl, 30 mM PO₄, 0,09 mM Spermin, 0,21 mM Spermidin und 0,3 % Phenolrot, pH 7,3

Vor der Injektion von Morpholinos wurde eine 3 millimolare Stockkonzentration 1 : 40 mit Injektionspuffer verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 1–1,5 nl mit einem Mikroinjektor in Fischeier des Einzellstadiums injiziert. Nach 48 Stunden wurden die Fische mikroskopisch analysiert.

2.2.5 Molekularbiologie

2.2.5.1 Standardtechniken

Techniken wie Restriktionsverdau mittels Endonukleasen, Ligation, RNS Präparation, cDNS-Synthese, Agarosegelelektrophorese, RNS- und DNS-Aufreinigung wurden wie in [147] beschrieben durchgeführt. Kits zur Aufreinigung von DNS oder RNS wurden entsprechend den Herstellerangaben (Macherey-Nagel, Düren, D) verwendet.

2.2.5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Konventionell:

Die Polymerase-Kettenreaktion [150] wurde für eine *in vitro* Amplifikation bzw. Mutagenese von DNA verwendet. Die Reaktion wurde in Anwesenheit von 0,2 mM dNTP's, 0,5 – 2,5 U DyNAzyme EXT, Reaktionspuffer des Herstellers (Finnzymes, Espoo, FIN), 30 pmol des jeweiligen Oligonukleotids und 2 bis 20 ng DNS-Template im PCR-Trio Block durchgeführt. Standardmäßig wurde die DNS 1 min bei 94 °C denaturiert, auf diesen Schritt folgten 35 Zyklen mit den folgenden Schritten: (1) Denaturierung für 30 sek bei 94 °C, (2) Anlagerung für 45 sek bei einer den Oligonukleotiden entsprechenden Schmelztemperatur und (3) Elongation entsprechend der Ablesegeschwindigkeit der Polymerase bei 72 °C. Final folgte eine Elongation bei 72 °C für 10 min. Im Anschluss an die PCR wurde eine Reinigung des PCR-Produktes nach Extraktion aus einem Agarosegel mit dem Nucleospin-Extrakt Kit nach Herstellerangaben (Macherey-Nagel, Düren, D) durchgeführt.

Reverse Transkriptase (RT-) PCR:

Diese PCR wurde in einem Thermocycler von Biometra in einem Endvolumen von 20 μ l durchgeführt. Der Reaktionsmix setzte sich wie folgt zusammen: 200 μ M dNTPs; 1,5 mM Mg^{2+} ; etwa 4 ng DNS; 0,5 μ M von jedem Primer und 1,25 U rekombinanter Tag-Polymerase. Das Template wurde bei 95 °C für 2 min denaturiert und anschließend wiederholte sich das nachfolgende Programm 34-mal: 95 °C für 30 sek, 54/60 °C für 45 sek und 72 °C für 40 sek. Eine abschließende Elongation erfolgte bei 72 °C für 10 min. Als Positivkontrolle wurde G3PDH verwendet.

Quantitative-(RT)-PCR:

Für die Analyse der relativen Genexpression wurde das 'ABsoluteTMQPCR SYBR®Green Mix Plus ROX Vial' der Firma Thermo Scientific nach Herstellerangaben verwendet. Für die Amplifikation wurde das folgende Programm in einem Stratagen-Cycler verwendet: ein Zyklus: 95 °C für 15 min, 50 Zyklen: 95 °C für 20 sek und 60 °C für 30 sek und abschließend ein Zyklus 95 °C für 1 min, 55 °C für 30 sek und 95 °C für 30 sek.

2.2.5.3 Ortsgerichtete Mutagenese

Eine ortsgerichtete Mutagenese erfolgte nach dem Prinzip der *whole-cycle* Methode mit Hilfe von zwei spezifischen Oligonukleotiden [151,152].

2.2.5.4 DNS-Sequenzierung

Alle in dieser Studie verwendeten Vektoren wurden bei SeqLAB (Göttingen, D) oder Genterprise (Mainz, D) sequenziert.

2.2.5.5 Microarrayanalyse

Änderungen in der Expression einzelner Gene wurden durch eine Microarrayanalyse ermittelt. Hierzu wurden HeLa-Zellen zweimal im Abstand von drei Tagen mit Grx3 spezifischer siRNA oder mit Kontroll-siRNA transfiziert, 24-Stunden vor dem Ernten wurden die Zellen mit 100 ng/ml Phorbol ester stimuliert. Anschließend wurden die Zellen entsprechend Abschnitt 2.2.2.6 geerntet. Zellen, die für eine weitere RNS-Isolation verwendet werden sollten, wurden direkt nach dem Waschschrift in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

RNS-Isolation: Für Microarrayanalysen wurde Gesamt-RNS mit dem NucleoSpin-RNA II Kit nach Herstellerangaben (Macherey-Nagel, Düren, D) gereinigt. Die Qualität der RNS wurde mit dem RNA 6000 Nano Chip kit (Agilent Technologies, Waldbronn, D) entsprechend den Angaben des Herstellers bestimmt.

Synthese und Aufreinigung von cDNS und cRNS: Alle nachfolgenden Schritte wurden entsprechend dem „GeneChip whole Transcript (WT) Sense Target Labeling Assay Manual Version

4“ (Affymetrix, High Wycombe, GB) durchgeführt. Für die Zwei-Schritt cDNS-Synthese wurden 300 ng Total-RNS verwendet.

Labeling und Hybridisierung des GeneChip 1.0 ST: Vor der Hybridisierung des Genechip 1.0 ST wurde die fragmentierte cDNS mittels DNS labeling Reagenz markiert. Schließlich wurden etwa 100 ng fragmentierte cDNS über Nacht auf dem GeneChip bei 45 °C und 60 upm hybridisiert.

Signaldetektion: Im Anschluss an eine 16-stündige Hybridisierung wurden die Chips entsprechend den Herstellerangaben gewaschen und ausgelesen.

Datenanalyse: Die Microarraydaten wurden mit dem Programm ChipInspector 2 von Genomatix ausgewertet. Die Daten wurden zunächst anhand der mittleren Intensität aller Daten normalisiert. Expressionsänderungen wurden durch proben-weise Division der Expressionswerte durch die der Kontrollwerte berechnet. Transkripte wurden als signifikant eingestuft, wenn mindestens 3 Proben detektiert wurden. Die dargestellten Expressionsänderungen entsprechen dem Mittelwert dieser signifikanten Proben (und nicht des gesamten Probensets). Daher führt das Programm keine weitere Filterung, z.B. nach einer minimalen Expressionsänderung, durch. Die statistische Analyse signifikanter Veränderungen führt die Software anhand eines T-tests mit Hilfe eines permutierten artifiziellen Hintergrundes durch. Jeder Probe wird ein Wert auf Basis der Veränderungen zugewiesen relativ zur Standardabweichung der Wiederholungen des Experimentes. Proben mit Werten über oder unter einem bestimmten Grenzwert ($\Delta_{\text{pos}}/\Delta_{\text{neg}}$) werden als signifikant betrachtet. Für die Auswertung wurde ein Δ_{pos} von 0,54 und ein Δ_{neg} von $-0,5$ benutzt. Theoretisch wären daher weniger als 0,2 % falsch-positive Ergebnisse für positive und negative Expressionänderungen zu erwarten. Weitere Details zur statistischen Auswertung der Daten durch die Software sind im ChipInspector 2 Handbuch (erhältlich unter www.genomatix.de) aufgeführt.

2.2.6 Proteinbiochemie

2.2.6.1 Proteinreinigung

Homogenisationspuffer: 300 mM NaCl, 25 mM NaH₂PO₄, 25 mM Na₂HPO₄, pH 8,0.

Äquilibrierungspuffer: 30 mM Imidazol in Homogenisationspuffer, pH 8,0. **Elutionspuffer:** 250 mM Imidazol in Homogenisationspuffer, pH 8,0.

Proteine, die mit einem His-Tag versehen sind, wurden nach dem IMAC-Prinzip (*immobilized metal affinity chromatography*) über eine Äkta gereinigt. Die eingefrorenen Bakterienpellets der Proteinexpression (siehe Abschnitt 2.2.1.4) wurden in 15 – 18 ml Äquilibrierungspuffer

aufgenommen und mittels EmulsiFlexC3 gekühlt homogenisiert. Im Anschluss wurde die Suspension bei $20000 \cdot g$ für 30 min bei 4°C in einer Beckmanzentrifuge zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde auf eine mit Äquilibrationpuffer äquilibrierte HisTrapTM-Säule aufgetragen. Die unspezifischen Bindungen wurden durch einen Waschschritt mit dem Puffer gelöst. Durch die Applikation von Elutionspuffer wurden Proteine, die über einen His-Tag an die Säulenmatrix gebunden waren, in 1 ml Fraktionen eluiert. Falls nötig wurden die Proteine mit vorgepackten Sephadex G-25 Säulen (PD-10 oder Nap5) nach Herstellerangaben (GE Healthcare) in den benötigten Puffer umgepuffert.

Bei einer anaeroben Reinigung wurden alle Puffer sowie das Äkta-System mit Argon begast.

2.2.6.2 Antikörperproduktion und Antikörperreinigung

Kopplungspuffer: 20 mM Na_2PO_4 , pH 7. **Elutionspuffer:** 0,1 M Glycin, pH 3,0.

Zur spezifischen Identifikation von Proteinen wurden polyklonale Antikörper aus Kaninchen verwendet. Für die Antikörperproduktion wurden die Kaninchen durch Injektion von 30 – 40 μg Protein immunisiert. Zur Verstärkung der Immunantwort wurde die Proteinlösung mit *Freunds Adjuvans* in einem Verhältnis von 1 zu 5 vermischt. Drei Wochen nach der ersten Injektion wurde ein weiterer Injektionsschritt mit 30 – 40 μg Protein in *Incomplete Freunds Adjuvans* durchgeführt. Dieser Injektionsschritt wurde ein- bis zweimal im Abstand von etwa 3 Wochen wiederholt. Acht bis zehn Tage nach jeder dieser Injektionen wurden den Kaninchen 20 bis 25 ml Blut zur Analyse der Antikörperseren entnommen.

Zur Aufbereitung der Seren wurde das entnommene Blut für 30 bis 120 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für fünf Minuten bei 5000 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut für 15 min bei 15000 upm zentrifugiert. Im letzten Schritt wurden die hitzelabilen Komponenten des Komplementsystems für 20 min bei 56°C inaktiviert. Im letzten Schritt wurden die Seren fraktioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert. Spezifische Aufreinigungen von Antikörpern aus Seren wurden mittels Cyanogenbromid (Cn-Br) aktivierter Sepharose durchgeführt. Hierfür wurden 0,5 g CnBr aktivierte Sepharose in Anwesenheit von 1 mM HCl gequollen. Nachdem die Sepharose mit 150 ml PBS gewaschen wurde, wurde die Matrix mit 2 ml Kopplungspuffer äquilibriert und sofort mit Protein in Kopplungspuffer für 90 min bei Raumtemperatur auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Anschließend wurden freie reaktive Gruppen durch Zugabe von 6 ml 1 M Ethanolamin pH 8 blockiert. Hierfür wurden die letzten 30 % des Ethanolamins für 2 Stunden mit der Säule inkubiert. Anschließend wurde die Säule wie folgt gewaschen: 6 ml 0,1 M Essigsäure mit 0,5 M NaCl; 6 ml 0,1 M Tris mit 0,5 M NaCl. Im nächsten Schritt wurde die Säule mit 10 ml Tris pH 7,5; 10 ml 100 mM Glyzin pH 2,5; 10 ml Tris pH 8,8 und 10 ml 10 mM Tris pH 7,5

äquilibriert. Nun wurden die Antiseren zugegeben und die Säulen mit 10 ml 10 mM Tris pH 7,5; 10 ml Tris pH 7,5 mit 0,5 M NaCl und 3 ml 10 mM Tris pH 7,5 gewaschen. Eluiert wurde der Antikörper mit 5 ml 100 mM Glycin pH 2,5 und direkt in 500 μ l Fraktionen fraktioniert. Durch Zugabe von 100 μ l 1 M Tris pH 8,8 wurde die Antikörperlösung neutralisiert. Die so gewonnenen gereinigten Antikörper wurden aliquotiert und bei -20 °C bis zu ihrer weiteren Verwendung gelagert.

2.2.6.3 Eindimensionale SDS-PAGE

Laufpuffer: 1 M Tris Base, 1 M HEPES, 0,1 % SDS

SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) wurde nach [153] durchgeführt. Routinemäßig wurde das X Cell System von Invitrogen nach Herstellerangaben verwendet. Bei der Verwendung von 4 bis 12 %igen Bis-Tris-Gradientengelen (Invitrogen, Karlsruhe, D) wurden die Proteinproben vor dem Auftragen auf das Gel mit 1/4 ihres Volumens 4-fach *NuPAGE^R LDS-Sample Buffer* und einer Endkonzentration von 10 mM DTT versetzt. Eine Separation der Proteine im Gel nach ihrer Größe erfolgte bei 200 V für 35 min. Als Puffer diente *NuPAGE^R MES-Puffer*. Alternativ wurden 4 bis 12 %ige HEPES-Gradientengele von Thermo Scientific (Schwerte, D) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Hier wurden die Proteinproben in 5-fach Probenpuffer (1/5 des Probenvolumens) aufgenommen und falls nicht anders erwähnt mit einer Endkonzentration von 10 mM DTT versetzt. Die Separation der Proteine erfolgte für etwa 40 Minuten bei 120 V in Gegenwart eines HEPES-haltigen Laufpuffers. In beiden Fällen wurden die Proben vor der Elektrophorese für 10 Minuten auf 95 °C erwärmt. Zur Bestimmung der Proteingröße wurden vor- oder ungefärbte Molekulargewichtsmarker (Fermentas, St. Leon-Rot, D) verwendet. Elektrophoretisch getrennte Proteine wurden entweder mittels Coomassiebrilliant Blue (Fermentas, St. Leon-Rot, D) gefärbt oder mittels Elektrottransfer auf eine PVDF-Membran transferiert (siehe Abschnitt 2.2.6.4).

2.2.6.4 Westernblot

Transferpuffer: 20 % (v/v) Methanol, 0,02 % (w/v) SDS, 20 mM Tris, 150 mM Glycin. **TBST:** 25 mM Tris, 150 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,05 % (v/v) Tween-20 pH 7,4. **Blockpuffer:** 5 % (w/v) Milchpulver in TBST. **Blockpuffer+:** Blockpuffer mit 1 % BSA. **Substratpuffer:** 97 ml Diethanolamin, 0,02 % NaN₃, 101 mg MgCl₂ * 6 H₂O mit Wasser auf einen Liter auffüllen; pH 9,8 **ECL1 Lösung:** 100 mM Tris, 2,5 mM Luminol in DMSO;

0,4 mM *p*-Coumarsäure in DMSO, pH 8,5 **ECL2 Lösung:** 100 mM Tris, 0,018 % (v/v) Wasserstoffperoxid, pH 8,5

Elektrotransfer

Mittels Elektrotransfer konnten Proteine, die in einer SDS-PAGE aufgetrennt wurden, auf einer PVDF-Membran mit dem X-Cell Blotmodul nach dem Wet-Blot-Prinzip entsprechend den Herstellerangaben (Invitrogen, Karlsruhe, D) immobilisiert werden. Bei Verwendung von Gelen mit einer Bis-Tris-Chemie (Invitrogen) erfolgte der Elektrotransfer für 60 min bei 30 V. Proteine aus Gelen mit einer HEPES-Chemie wurden 90 bis 120 min bei 40 V gekühlt transferiert. *Immunodetektion* Proteine, die auf einer PVDF-Membran immobilisiert wurden, konnten durch mono- oder polyklonale Antikörper spezifisch nachgewiesen werden.

Ausgehend von einem Transfer von Gelen mit einer Bis-Tris-Chemie wurden die PVDF-Membranen eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockpuffer inkubiert. Wurden für den Elektrotransfer Gele mit einer HEPES-Chemie verwendet, wurden die Gele zunächst 10 min in TBST gewaschen und dann eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockpuffer+ inkubiert. Nach Zugabe des Primärantikörpers zu dem jeweiligen Blockpuffer folgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttelinkubator. Erfolgte keine weitere Verstärkung der Signale wurde im Anschluss an fünf Waschschrte entweder ein Alkalische-Phosphatase- (chromophore Färbung) oder ein *horseradish* Peroxidase- (lumineszente Färbung) gekoppelter Sekundärantikörper zugegeben. Es folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Bei einer Verstärkung der Signale wurde nach Zugabe des Biotin-gekoppelten Sekundärantikörpers ALP- oder HRP- gekoppeltes Streptavidin zugegeben. Nach fünf Waschschrten wurde die Membran bei der chromophoren Färbung eine Minute in Substratpuffer inkubiert und anschließend mit der NBT/BCIP-Methode gefärbt. Für eine lumineszente Färbung wurde der Blot mit gleichen Teilen ECL1- und ECL2-Lösung inkubiert. Die Entwicklung der Blots erfolgte entweder unter Verwendung von Röntgenfilmen oder mit dem Chemostar System.

2.2.6.5 Experimentelle Bestimmung des apparenten Molekulargewichts von Proteinen

Um das Molekulargewicht von Proteinen bestimmen zu können, wurde eine Gelchromatografie durchgeführt. Hierfür wurde monomeres und dimeres hGrx3 mittels einer FPLC in Kombination mit einer Superdex 75 Präzisionssäule entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Für die Analyse wurde das Protein in 300 mM NaCl und 50 mM Na₂PO₄ bei pH 8 gelöst. Das System wurde durch Verwendung von Proteinen bekannter Größe kalibriert.

2.2.6.6 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Gesamtproteinextrakten wurde das Bio-Rad Protein Assay Kit entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Je nach Ausgangskonzentration wurden die Proteinextrakte zwischen 2-fach bis 320-fach verdünnt. Standards mit bekannten Proteinkonzentrationen wurden mit BSA hergestellt und analog zu den Proben wurden Doppelwerte gemessen.

Konzentrationen gereinigter Proteine wurden basierend auf ihrem Extinktionskoeffizienten (siehe Tabelle 2.10) bei OD₂₈₀ entsprechend dem Lambert-Beer'schen Gesetz bestimmt.

Tabelle 2.10: Parameter rekombinanter Proteine mit His-Tag.

Protein	Molekulargewicht [g/mol]	Extinktionskoeffizient bei 280 nm in [1/(M cm)]
hGrx3	37432	34170
mGrx3	39945,7	32680

2.2.6.7 Immunopräzipitation

Proteine können mittels Immunopräzipitation (IP) selektiv aus Zellextrakten gereinigt werden. In Abhängigkeit von der jeweiligen Fragestellung wurden entweder magnetische IPs oder quantitative IPs durchgeführt.

Bei einer magnetischen IP wurde das μ Macs-System (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Zum Waschen wurde PBS und für die Elution wurde auf 95 °C erwärmter Probenpuffer verwendet. Die so erhaltenen Proben wurden mit der Westernblot-Technologie analysiert. Für eine quantitative IP wurde polyklonaler Antikörper entsprechend dem *MAb purification, step elution* Programm nach den Angaben von GE Healthcare (München, D) vorfraktioniert. Anschließend wurden 100 mg CnBr-aktivierte Sepharosebeads für 15 min bei Raumtemperatur in 1 ml kaltem PBS gequollen. Um das PBS zu entfernen, wurden die Sepharosebeads für 5 min bei 4000 $\cdot g$ zentrifugiert. Anschließend wurden die Sepharosebeads in Anwesenheit von 3,5 ml vorfraktioniertem Antikörper, dem Äquivalent zu einem Milliliter Serum, für 90 min bei Raumtemperatur auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Danach wurden die mit Antikörper konjugierten Sepharosebeads 5-mal mit 500 μ l PBS gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden die Beads für 5 min bei 3000 $\cdot g$ zentrifugiert. Zur Blockade der verbleibenden reaktiven Gruppen der CnBr aktivierten Sepharose wurde diese mit 1 M Ethanolamin pH 8 für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, abschließend 5 mal mit 500 μ l PBS gewaschen und sofort für eine quantitative IP verwendet bzw. bei 4 °C bis zu ihrer späteren Verwendung gelagert. Bei einer quantitativen IP

wurden 20 μl Antikörper konjugierte Sepharosebeads mit 1 mg Proteinextrakt über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden ungebundene Proteine durch 4 Waschschrte mit PBS entfernt. Schließlich wurden die Proben mit 20 μl 2-fach Probenauftragspuffer 10 min bei 95 °C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 5 min bei 13000 · g wurde der Überstand mit 10 mM DTT versetzt und konnte für einen Westernblot verwendet werden.

2.2.6.8 Co-Immunopräzipitation von Proteinen

Mittels Co-Immunopräzipitation können Protein-Protein-Interaktionen untersucht werden. Im Anschluss an eine IP gegen den einen Interaktionspartner wurde in einem nachfolgenden Westernblot eine Immunfärbung gegen den anderen Interaktionspartner durchgeführt.

2.2.6.9 Co-Immunopräzipitation von ^{55}Fe mit Grx3

Zunächst wurden Jurkat-Zellen für 48 Stunden unter Kultivierungsbedingungen in Anwesenheit von 1 mCi ^{55}Fe (Herstellung siehe Abschnitt 2.2.6.10), welches an Transferrin gekoppelt war, inkubiert. Vor der Immunopräzipitation wurden IgGs aus einem polyklonalen Kaninchen-serum entsprechend Abschnitt 2.2.6.7 gereinigt und an CnBr-aktivierte Sepharose gekoppelt. Für die Immunopräzipitation wurden geklärte Proteinextrakte (4,5 mg Gesamtprotein) mit PBS auf einen Milliliter eingestellt und mit an Sepharose gekoppelten Antikörpern über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Sepharose wurde anschließend so lange mit PBS gewaschen, bis keine ^{55}Fe -Aktivität mehr im Überstand nach Zentrifugation nachgewiesen werden konnte. Das gebundene ^{55}Fe wurde durch Szintillationszählung von der resuspendierten Sepharose bestimmt.

2.2.6.10 Kopplung von Transferrin mit ^{55}Fe

Zur Herstellung von radioaktiv markiertem ^{55}Fe -Transferrin, wurde zunächst eine etwa 200 nmol ^{55}Fe (entsprechend 1 mCi) in ca. 24 μl 0,5 M HCl-Lösung hergestellt. Anschließend wurden tropfenweise etwa 11,8 μl 1,7 M Na_3Citrat -Lösung zugegeben. Dann wurde das Gemisch mit 0,3 ml einer 1 molaren Natrium-Bikarbonat-Lösung und 164 μl Wasser versetzt. Schließlich wurden 100 nmol Transferrin zu dem Gemisch gegeben und alles für 4 – 6 Stunden inkubiert. Abschließend wurde das entstandene ^{55}Fe -Transferrin über eine Nap-5 und anschließend über eine PD10-Säule entsalzen und die Menge an ^{55}Fe -Transferrin bestimmt ($E_{465}=4620(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$).

2.2.6.11 Bestimmung des Eisengehaltes

Freisetzungspuffer: 0,6 N HCl, 0,142 M KMnO_4 . **Ferrozinlösung:** 6,5 mM Ferrozin, 13,1 mM Neocuprion, 2 M Ascorbinsäure und 5 M Ammoniumacetat.

Für die Bestimmung von Eisen wurde die Methode von Fish durchgeführt [154]. Alle Angaben beziehen sich auf ein Reaktionsvolumen von 1 ml. Zunächst wurde die Proteinlösung, deren Eisengehalt bestimmt werden sollte mit 0,5 ml Freisetzungspuffer versetzt und 2 Stunden bei 60 °C inkubiert. Die Ansätze wurden auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 100 μ l Ferrozin-Lösung versetzt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben für 5 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Abschließend wurde der Fe(II)[Ferrozin]₃ 2+-Komplex bei 562 nm bestimmt.

2.2.6.12 Bestimmung des Sulfidgehaltes

Für eine Bestimmung des säurelabilen Sulfids von Proteinen wurde die Methode nach Beinert [155] und Broderick [156] in modifizierter Form durchgeführt. Zu 47,8 μ l Proteinlösung, deren Sulfidgehalt bestimmt werden sollte, wurden gleichzeitig 145 μ l Zinkacetat (1 %) und 7,2 μ l NaOH (12 %) gegeben. Nun wurden die Proben für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und gleichzeitig je 25 μ l N,N-dimethyl-p-phenylendiaminsulfat 0,1 % in 7,2 N HCl und FeCl₃ (0,1 %) in 1,2 N HCl zugegeben. Nun wurden die Proben gemischt und 30 min im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurden die Proben bei 650 nm gemessen.

2.2.7 Spektroskopie

2.2.7.1 Absorptionsspektroskopie

Spektren wurden in einem Bereich von 186,5 bis 722 nm mit einem Spectrocord S300 UV/VIS Spektralphotometer aufgenommen. Für die Spektren wurden unverdünnte Proteinproben, bzw. Verdünnungen zwischen 1 zu 2 bis 1 zu 50 verwendet.

2.2.7.2 Mößbauerspektroskopie

Mößbauer-Spektren wurden mit einem Spektrometer bei alternierender konstanter Beschleunigung aufgenommen. Als minimale experimentelle Bandbreite wurden 0,24 mm/s (volle Breite bei halber Höhe) gewählt. Die Proben temperatur wurde in einem Oxford Instruments Variox oder einem Kryostaten von Oxford Instruments Mössbauer Spectromag konstant gehalten. Isomer-Shifts wurden relativ zum Eisenmetall bei 300 K benannt. Als Probe diente mit ⁵⁷Fe-gelabeltes Grx3, das in ⁵⁷Fe angereichertem Vogel-Bonner-Medium in *E. coli* exprimiert wurde. Anfertigung der Spektren mit freundlicher Unterstützung von Eckhard Bill, Max-Planck-Institut für Bioinorganische Chemie, Mühlheim an der Ruhr, Deutschland.

2.2.7.3 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Für die Durchführung der Elektronenspinresonanz (EPR)-Spektroskopie wurde rekonstituiertes und entsalztes Grx3 in EPR-Gefäße überführt. Zur Reduktion des Fe/S-Zentrums wurde Natrium-Dithionit mit einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben. Vor dem Schockfrieren wurde das EPR-Gefäß verschlossen.

Niedrig-Temperatur X-band EPR-Spektren wurden mit einem Bruker E300E cw Spektrometer mit einem EPR910 Oxford instruments Helium-fluß Kryostaten gemäß [157, 158] aufgenommen. Die Aufnahme der Spektren erfolgte unter Mithilfe von Herrn Priv. Doz. Dr. rer. nat. Antonio Pierik (Institut für klinische Zytobiologie).

2.2.8 Mikroskopie

2.2.8.1 Konfokale Mikroskopie

Mikroskopische Studien wurden unter Verwendung des konfokalen Mikroskops TCS SP2 zusammen mit einem 40-fach Öbobjektiv (Planachromat) durchgeführt. Routinemäßig wurden mehrere Ebenen mit einer Auflösung von 1024×1024 Pixeln aufgenommen. Zusätzlich wurden die Bilder durch Verwendung des Scanners 1- bis 10-fach vergrößert. Die Dekonvolution der Bilder wurde mit dem Huygens Softwarepaket durchgeführt.

2.2.8.2 Immunocytochemie

Block- und Permeabilisationspuffer: 10 mM HEPES, 3 % BSA, 0,3 % (v/v) Triton in PBS.

Nachdem Zellen auf Deckgläser ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert wurden, konnten die Mitochondrien angefärbt (siehe Abschnitt 2.2.8.3) und die Zellen mit 4 %-igem Paraformaldehyd (PFA) für 30 min bei Raumtemperatur fixiert werden. Anschließend wurde das PFA in drei Waschschritten mit PBS rückstandslos entfernt und die Zellen eine Stunde bei Raumtemperatur mit Block- und Permeabilisierungspuffer inkubiert. Der Primärantikörper wurde in der notwendigen Verdünnung in Block- und Permeabilisierungspuffer zugegeben und die Deckgläser über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann dreimal mit PBS gewaschen, um ungebundenen Primärantikörper zu entfernen. Im Anschluss wurde der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1 zu 400 zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nachdem der Sekundärantikörper entfernt wurde, war eine Färbung des Aktinzytoskeletts oder des Zellkerns möglich. Bevor die Zellen über Nacht mit Mowiol bei Raumtemperatur eingebettet werden konnten, musste der überschüssige Puffer restlos entfernt werden. Die Präparate wurden bis zu ihrer weiteren Analyse bei 4 °C dunkel gelagert.

2.2.8.3 Färbung von Zellorganellen

Mitochondrien wurden in lebenden Zellen durch Applikation von Mitotracker Deep Red 633 gefärbt. Hierzu wurden lebende Zellen mit 200 nM Mitotracker für 20 Minuten unter Kultivierungsbedingungen gefärbt. Zur Visualisierung von Zellkernen wurden fixierte Zellen für 10 min bei Raumtemperatur mit 1 ng/ml DAPI inkubiert. Eine rückstandslose Entfernung von überschüssigem DAPI erfolgte in drei Waschschritten mit PBS.

2.2.8.4 Aktinfärbung

Nach dem Fixieren von Zellen mit 4 % PFA für 30 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und eine Stunde mit Block- und Permeabilisierungspuffer inkubiert. Im Anschluss an eine mögliche immunocytochemische Färbung konnte das Aktin-Zytoskelett mit 6,6 nM Phalloidin Alexa Fluor 546 in PBS mit 1 % BSA durch eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur angefärbt werden. Die Deckgläser wurden mittels Mowiol auf Objektträgern über Nacht bei Raumtemperatur fixiert und bis zu ihrer weiteren Analyse bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

2.2.8.5 Immunohistochemie

Mäuse vom Stamm 129 oder C57BL6 (Alter: 6 Wochen bis 6 Monate) wurden durch zervikale Dislokation getötet und mit Perfusionspuffer perfundiert. Die im Weiteren zu untersuchenden Organe wurden entnommen, ggf. zerkleinert und in 4 % PFA 24 Stunden bei 4 °C fixiert. Im Anschluss wurden die zu untersuchenden Organe 3 Stunden mit Leitungswasser gewässert und in 70 % Ethanol über Nacht bei 4 °C gelagert. Die Organe wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (80 % Ethanol, 96 % Ethanol und in zwei Schritten in Isopropanol für je 2 Stunden) inkubiert und anschließend in Paraffin über Nacht bei 60 °C im Brutschrank belassen. Am nächsten Tag wurde das Paraffin gewechselt und die Organe erneut 6 Stunden bei 60 °C inkubiert. Die Organe wurden im nächsten Schritt in Paraplast ausgeblockt und mit dem Mikrotom Schnitte mit einer Dicke von ca. 10 µm angefertigt, die auf Objektträgern immobilisiert wurden. Zunächst wurden die Proben unter Anwendung einer absteigenden Alkoholreihe deparaffiniert und endogene Peroxidasen in 3 % Wasserstoffperoxid für 10 min blockiert. Nach drei Waschschritten in PBS wurden unspezifische Antikörper-Bindestellen durch eine 60-minütige Inkubation mit 10 % Ziegeneserum blockiert. Als nächstes wurde der Primärantikörper (siehe Tabelle 2.11) in einer entsprechenden Verdünnung in 10 % Ziegeneserum auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Antikörper mit drei Waschschritten in PBS rückstandslos entfernt und die Schnitte mit Ziege-anti-Kaninchen-Biotin Antikörper in einer Verdünnung von 1 zu 500 für eine Stunde in-

kubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von StreptavidinABComplex/HRP für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss an drei Waschschritte in PBS wurden die Proben mit dem Substrat Aminoethylcarbozol (AEC) für 5 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Applikation von Wasser gestoppt. Kofärbungen wurden mit Mayers Hämatoxylin durchgeführt. Für die weitere Verwendung wurden die Schnitte in Mowiol eingebettet und im Dunkeln gelagert.

Für eine Analyse der Präparate wurde ein Leica Diaplan Mikroskop verwendet. Das Mikroskop war mit einer *MicroPublisher* Kamera der Firma QImaging versehen. Ein Weißabgleich der Bilder erfolgte mit der *GNU Image manipulation* Software.

Tabelle 2.11: Antikörper für die Immunohistochemie.

Name	Quelle	Wirt	Verdünnung
Grx1	[159]	Kaninchen	1 : 100
Grx2	[160]	Kaninchen	1 : 200
Grx3	[159]	Kaninchen	1 : 50
Grx5	[159]	Kaninchen	1 : 500
Prx1	[159]	Kaninchen	1 : 100
Prx2	Santa Cruz Biotechnology Inc.	Kaninchen	1 : 200
Prx3	[159]	Kaninchen	1 : 500
Prx4	Abcam	Kaninchen	1 : 200
Prx5	[159]	Kaninchen	1 : 200
Prx6	Abcam	Kaninchen	1 : 500
Trx1	[159]	Kaninchen	1 : 200
Trx2	[159]	Kaninchen	1 : 100
TrxR1	[159]	Kaninchen	1 : 50
TrxR2	Santa Cruz Biotechnology Inc	Kaninchen	1 : 50

2.2.9 Aktivitätstests

2.2.9.1 Rekonstitution von Fe/S-Zentren in monothiol Glutaredoxinen

Für die *in vitro* Rekonstitution von Fe/S-Zentren wurden 50-200 μ M Protein in einer anaeroben Kammer (Coy, Grass Lake, USA), wie in [22] beschrieben, verwendet. Für die Reaktion wurden 2,5-5 molare Äquivalente von FeCl_2 und GSH verwendet. Die Menge an Eisen und säurelabilem Sulfid, die an Grx3 gebunden sind, wurden entsprechend [154, 161] bestimmt.

2.2.9.2 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Aco-Puffer: 100 mM Triethanolamin, 1,5 mM MgCl_2 , 0,1 % Triton X-100, pH 8,0. **LDH-Puffer:** 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,1 % Triton X-100, pH 7,4. **SDH-Puffer:** 50 mM Tris/ SO_4 , 0,1 mM EDTA, 70 μ M Dichlorophenol-Indophenol, 0,1 % Triton X-100, pH 7,4. **CS-Puffer:** 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 0,5 mM DTNB, 0,1 % Triton X-100, pH 8,0. **Com-Puffer:** 15 mM K_2HPO_4 , 0,5 mM DDM, 0,1 % BSA, pH 7,2.

Gesamtlysate, zytosolische und mitochondrienangereicherte Fraktionen wurden entsprechend Abschnitt 2.2.2.7 hergestellt. Zur Bestimmung der Enzym-Aktivität in den drei Fraktionen der Zellfraktionierung wurde ein kolorimetrischer Assay verwendet. Alle Werte wurden als Duplikate bestimmt. Die entsprechenden Referenzwerte wurden in Abwesenheit des Substrats als Duplikate bestimmt und von den Proben abgezogen. Die Assays wurden im Spektrometer gemessen. Für die durchgeführten Assays wurden die folgenden Puffer und Spektrometereinstellungen verwendet: Aconitase: Aco-Puffer, 340 nm, 60 min; Lactatdehydrogenase: LDH-Puffer, 340 nm, 30 min; Succinatdehydrogenase: SDH-Puffer, 600 nm, 30 min; Citratsynthase: CS-Puffer, 412 nm, 30 min; Komplex IV: Com-Puffer, 550 nm, 1 min.

2.2.9.3 Bestimmung der Bindekapazität von IRP

Die durch IRE - vermittelte RNS-Bindekapazität von IRP1/2 wurde mit dem *RNA electrophoretic mobility shift assay* (REMSA) entsprechend [162, 163] durchgeführt. Um die IRP1 Bindeaktivität bestimmen zu können, wurden die Zell-Lysate mit einem anti-IRP2-Antikörper versehen. So kam es zu einem Supershift von IRP2, wodurch die Bindeaktivität von IRP1 untersucht werden konnte. Für die Bestimmung der IRP2-Bindekapazität erfolgte eine analoge Behandlung der Proben mit einem anti-IRP1-Antikörper.

2.2.10 Computer basierte Arbeiten

2.2.10.1 Analyse von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurden vor ihrer Verwendung sequenziert. Ferrogramme wurden mittels FinchTV analysiert und Sequenzvergleiche wurden mittels BLAST oder CLC Workbench durchgeführt. Berechnungen zur Ermittlung der Extinktionskoeffizienten und der Molekulargewichte von Proteinen wurden mittels ProtParam durchgeführt.

2.2.10.2 Abbildungen

Abbildungen wurden mittels The Gimp oder InkScape angefertigt. Diagramme wurden mit Microsoft Open Office und Xmgrace erstellt. Die Dekonvolution der Bilder wurde mit dem Huygens Softwarepaket durchgeführt.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von Grx3

In der Literatur wird Grx3 als Interaktionspartner der PKC θ beschrieben, woraus Funktionen in der T-Zellaktivierung und der Herzhypertrophie gefolgert werden. Allerdings ist Grx3 bisher kaum biochemisch charakterisiert und auch über Expression und Lokalisation des Proteins ist bisher nur wenig bekannt. Die im Folgenden beschriebenen Genanalysen werden exemplarisch für humanes Grx3 gezeigt, während die durchgeführten Lokalisationsstudien in Maus und Mensch durchgeführt wurden.

3.1.1 Identifikation von humanem Grx3

In den Gendatenbanken sind zwei unterschiedliche Sequenzen für humanes Grx3 annotiert. Ein Gen ist auf Chromosom 10q26 und das andere Gen ist auf Chromosom 6p25 lokalisiert. Ein Vergleich der beiden Gensequenzen identifizierte das Gen auf Chromosom 6 als Pseudogen (siehe Abbildung 3.1 (A)). In der Analyse stellte sich heraus, dass dieses Gen stark fragmentiert war. Diese Modifikationen könnten beispielsweise aus einem ungleichen *crossing-over* resultieren. Ferner wies die Gensequenz auf Chromosom 6 kein Startcodon auf. Aus den angeführten Gründen ist ersichtlich, dass es sich um eine „nicht-funktionelle“ Sequenz von Grx3 handelte, die für ein nicht-funktionelles Protein codierte.

Das für humanes Grx3 codierende Gen setzte sich aus 12 Exonen zusammen, von denen die ersten vier Exone die Trx-Domäne, Exon vier bis sechs die erste Grx- (GrxA-) Domäne und die letzten sechs Exone die zweite Grx- (GrxB-) Domäne kodierten. Das letzte Exon war im 5'-UTR lokalisiert (siehe Abbildung 3.1 (B)).

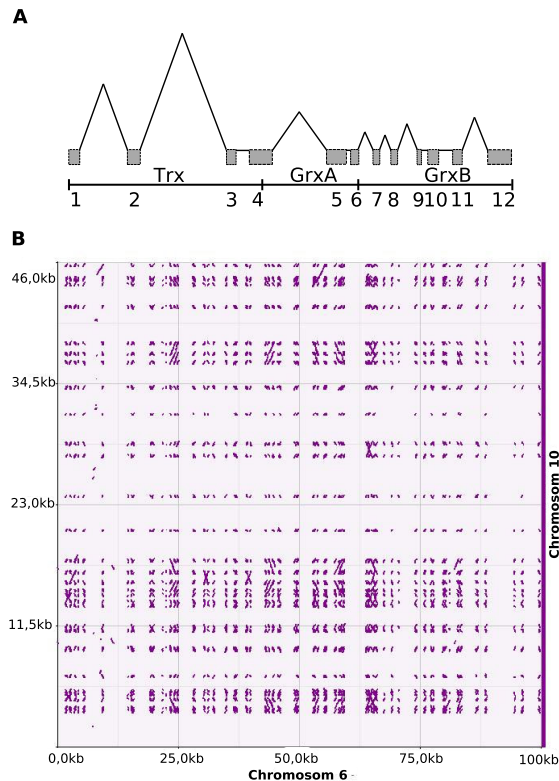


Abbildung 3.1: **Identifikation der Gensequenz für humanes Grx3.** (A) Maßstabsgetreue Darstellung der Intron-/Exonstruktur von humanem Grx3. Exone 1 bis 4 kodieren die Trx-Domäne. Exone 4 bis 6 kodieren für die GrxA-Domäne und Exone 7 bis 12 kodieren für die GrxB-Domäne. (B) Identifikation der Gensequenz für humanes Grx3. Dot matrix view des Alignments der Gensequenzen von Grx3 auf Chromosom 10 und auf Chromosom 6.

3.1.1.1 Phylogenetische Verwandtschaft von Grx3 verschiedener Spezies

Zur Ermittlung des Verwandtschaftsgrades von Grx3-Proteinen verschiedener Spezies wurde eine phylogenetische Untersuchung durchgeführt. Hierzu wurde die Aminosäuresequenz von humanem Grx3 in einem Alignment bestehend aus Grx3 aus Einzellern, Insekten, Vertebraten, Invertebraten, Pflanzen und Pilzen eingefügt. Hierbei zeigte sich, dass die Grx-Domänen zwischen Hefe, Pflanzen und Menschen mit 50 % eine höhere Identität aufwiesen als die Trx-Domänen, bei der die Identität weniger als 30 % betrug. Der anhand dieses Alignments berechnete Stammbaum (siehe Abbildung 3.2) zeigte, dass Grx3 ein Protein mit einer hohen Identität zwischen den verschiedenen Spezies aufweist.

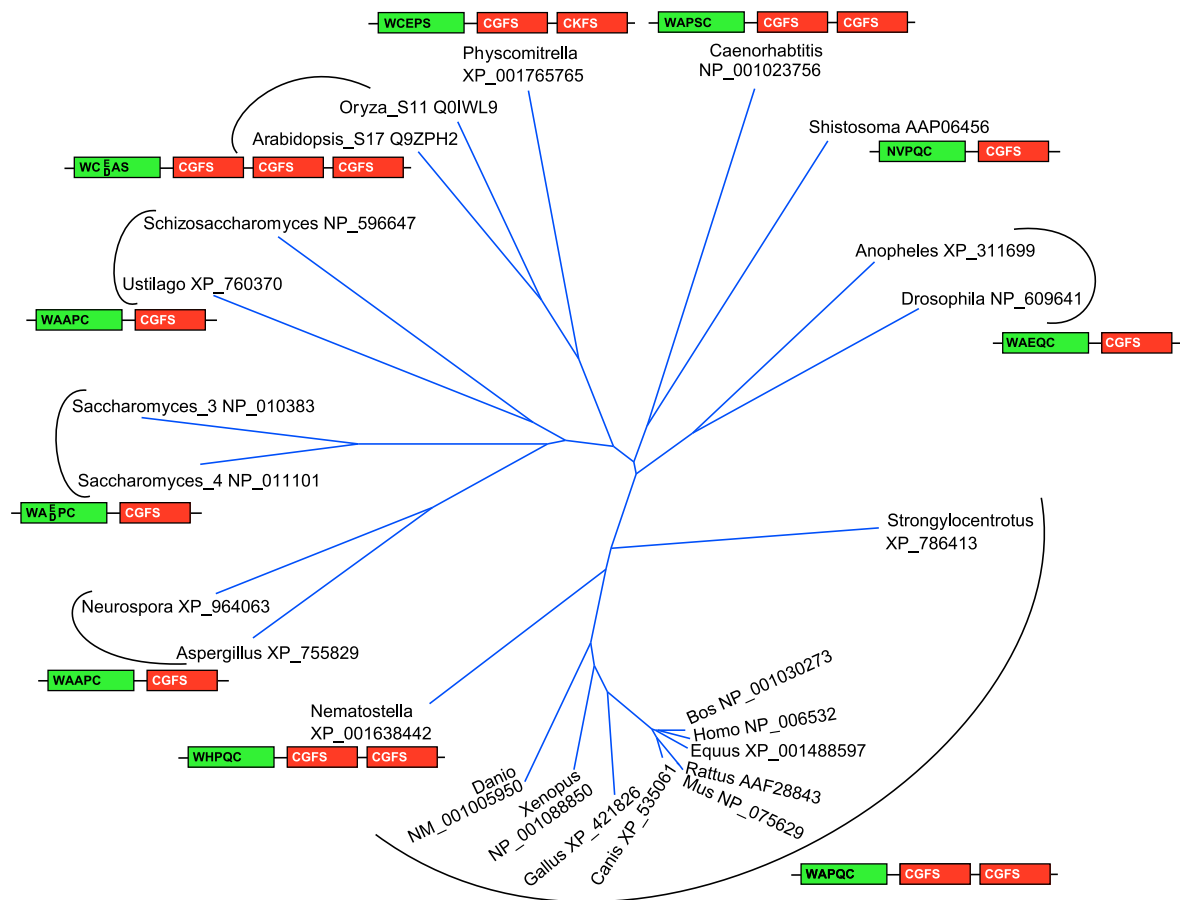


Abbildung 3.2: *Phylogenetische Analyse von Grx3*. In der Analyse wurde die Aminosäuresequenz von Grx3 in ein Alignment bestehend aus Sequenzen von Grx3 verschiedener Spezies eingefügt. Die Analyse wurde unter Verwendung des Phylip Programms durchgeführt (grün: Trx-Domänen, rot: Grx-Domänen).

3.1.1.2 Klonierung und rekombinante Expression von Grx3

Die Klonierung des Gens von humanem und murinem Grx3 aus cDNS in den Vektor pET15b und die anschließende Transformation des Plasmids in *E. coli* BL21(DE3)codonplus ist eine Möglichkeit zur rekombinanten Expression von Grx3 als His-tag Fusionsprotein. Zur Analyse der Effizienz von Expression und Reinigung wurde ein Coomassie-gefärbtes SDS-Gel angefertigt. Abbildung 3.3 zeigt für beide Proteine eine Proteinbande bei ca. 40 kDa in ausreichender Reinheit.

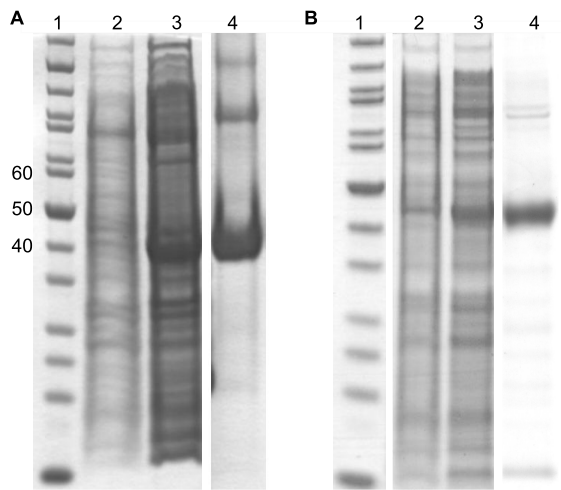


Abbildung 3.3: **Expression und Reinigung von Grx3.** Gezeigt sind Coomassie-gefärbte Gradientengele. (A) Expression und Reinigung von humanem Grx3 aus *E.coli* BL21(DE3)codonplus transformiert mit *hGrx3-pET15b*. (B) Expression und Reinigung von murinem Grx3 aus *E.coli* BL21(DE3)codonplus transformiert mit *hGrx3-pET15b*. Spur 1: Standard, Spur 2: Rohextrakt von *E.coli* BL21(DE3)codonplus vor der Induktion der Expression von *hGrx3* (A) oder *mGrx3* (B) und Spur 3: Extrakt von *E.coli* BL21(DE3)codonplus nach Induktion der Expression von *hGrx3* (A) oder *mGrx3* (B). Es wurden gleiche Mengen aufgetragen. 4: gereinigtes Grx3-His-Tag-Fusionsprotein.

3.1.1.3 Produktion und Evaluation Grx3 spezifischer Antikörper

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Antikörper sowohl gegen humanes als auch murines Grx3 entwickelt. Hierzu wurden die entsprechenden Proteine rekombinant exprimiert und in zwei Schritten gereinigt. Zunächst erfolgte eine Reinigung über den His-Tag des Proteins und daran anschließend eine weitere Reinigung über einen Kationenaustauscher. Das gereinigte Protein wurde entsprechend dem in Abschnitt 2.2.6.2 beschriebenen Verfahren in ein Kaninchen injiziert. Die aus dem Blutserum gewonnenen Antikörper wurden vor ihrer weiteren Verwendung auf Spezifität und Sensitivität hin überprüft. Eine Westernblotanalyse zeigte, dass eine Verdünnung von eins zu tausend für beide Antikörper Proteine in einem ausreichenden Grad an Spezifität und Sensitivität detektierte. Kontrollexperimente zeigten, dass der murine Antikörper nach Affinitätsreinigung in immunohistochemischen Analysen Grx3 spezifisch detektieren konnte (siehe Abbildung 3.4). In dieser Arbeit wurden immunocytochemische Analysen in HeLa-Zellen ausschließlich mit dem human-Grx3 spezifischen Antikörper durchgeführt. Entsprechende Kontrollexperimente werden in Abschnitt 3.1.2.3 ausführlich betrachtet. Für Westernblotanalysen und Immunopräzipitationen wurde ebenfalls der human-spezifische Antikörper verwendet.

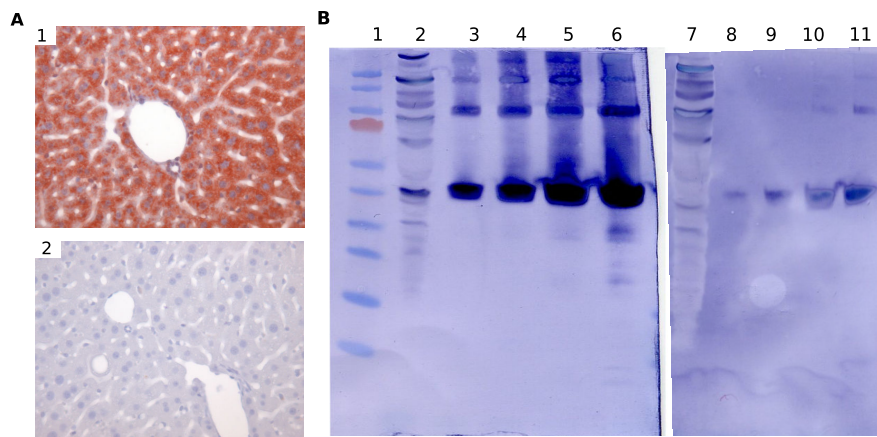


Abbildung 3.4: **Validierung von Antikörpern gegen humanes und mausspezifisches Grx3.** Blockexperimente zur Überprüfung der Spezifität von polyklonalen anti-Grx3-Antikörper. (A) Von der Leber einer Maus wurden Paraffinschnitte mit einem affinitätsgereinigtem polyklonalen anti-Maus-Grx3-Antikörper gefärbt. In (1) wurde der Antikörper 1 zu 25 verwendet in (2) wurde der verwendete Antikörper zuvor gegen sein Antigen affinitätsgereinigt. (B) Westernblot mit einer anti-HumanGrx3-Antikörperkonzentration von 1 zu 1000; Spur 1: Standard, Spuren 2 und 7: 60 µg HeLa-Proteinextrakt, Spuren 3 und 8: 10 ng gereinigtes human Grx3, Spuren 4 und 9: 31,4 ng gereinigtes human Grx3, Spuren 5 und 10: 100 ng gereinigtes human Grx3, Spuren 6 und 11: 314 ng gereinigtes human Grx3. Signale in den Spuren 2 bis 5 wurden mit unblockierter Grx3-Antikörperlösung detektiert, während für die Detektion der Signale in den Spuren 6 bis 11 der Grx3-spezifische Antikörper zuvor mit Antigen in einer Konzentration von 200 µg/ml blockiert wurde.

3.1.1.4 Abschalten der Grx3-Expression durch siRNA Transfektion

Zur Analyse von Genfunktionen sollte das endogene Grx3-Level durch Einsatz der RNS-Interferenz-Technik unter Verwendung von siRNA reduziert werden. In ersten Vorversuchen wurden HeLa-Zellen mit drei verschiedenen Grx3 spezifischen siRNAs transfiziert. Als siRNA wurden folgende Konstrukte verwendet: siGrx3(TS1), mit einer komplementären Sequenz in Exon 5 beginnend ab Nukleotid 577; siRNA siGrx3(TS2) komplementär zu einer Sequenz in Exon 2 beginnend ab Nukleotid 150 oder siGrx3(TS3) mit einer komplementären Sequenz 4 beginnend ab Nukleotid 454. Drei Tage nach der Transfektion wurde eine Westernblotanalyse durchgeführt, in der die siGrx3(TS1) das endogene Grx3-Level am deutlichsten reduzierte (Daten nicht gezeigt). Alle weiteren Versuche wurden ausschließlich mit der siGrx3(TS1) siRNA durchgeführt. Eine Kinetik der Verminderung des Grx3-Levels zeigte, dass bereits

am Folgetag der Transfektion eine deutliche Reduktion der Expression auf Proteinebene detektierbar war. Die deutlichste Reduktion ist exemplarisch in Abbildung 3.5 gezeigt. Der Proteingehalt reduzierte sich bis zum 4ten Tag nach der Transfektion und stieg anschließend langsam an. Zur Steigerung der Reduktion im Grx3-Level auf unter 10 % und um Folgeaktionen des *Knock-downs* in die Analysen mit einbeziehen zu können, wurden HeLa-Zellen in den durchgeführten Experimenten zwei- bis dreimal in einem Abstand von drei Tagen transfiziert (siehe beispielsweise Abbildung 3.24). Durch die Transfektion waren keine Unterschiede im Wachstum der Zellen unter Standardbedingungen erkennbar.

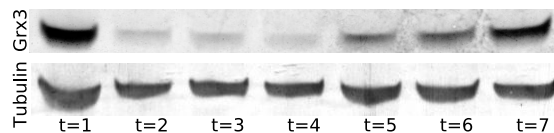


Abbildung 3.5: *Spezifische Reduktion von Grx3 nach siRNA Transfektion. Kinetik des Grx3-Proteinlevels nach Transfektion mit siGrx3(TS1). Die HeLa-Zellextrakte wurden mittels Westernblot analysiert.*

3.1.2 Expression und Lokalisation von Grx3 in Vertebraten

Über die Funktion und Verteilung von Grx3 in den unterschiedlichen Organen ist in der Literatur bisher wenig beschrieben [94, 108, 109]. In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen die Expression von Grx3 in humanen Organen mittels RT-PCR analysiert und zum anderen wurde die Expression und Verteilung von Grx3 in Mausorganen immunohistochemisch untersucht. Durch den Nachweis von Grx3 in einer Vielzahl von Organen, wird ein detaillierter Überblick über die Verteilung dieses Proteins in Mausorganen geschaffen, aus dem potentielle Rollen und Interaktionen von Grx3 in Krankheitsprozessen abgeleitet werden können.

3.1.2.1 Expression im Menschen

Zunächst sollte ein Überblick über das Expressionsmuster von humanem Grx3 in menschlichen Organen geschaffen werden. Hierzu wurde eine RT-PCR-Analyse auf 16 humane Organe durchgeführt. Die hierfür benötigte cDNS wurde von Clontech-Takara Bio Europe (Saint-Germain-en-Laye, FR) erworben. Eine Überprüfung der Expression von Grx3 erfolgte in: Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere, Pankreas, Milz, Thymus, Prostata, Testis, Ovar, Dünndarm, Kolon und Leukozyten (siehe Abbildung 3.6). Es wurde eine ubiquitäre Expression von Grx3 festgestellt. Die Differenzen in der Expression waren allerdings zu gering, um quantitative Aussagen über Unterschiede in der Expression treffen zu können.



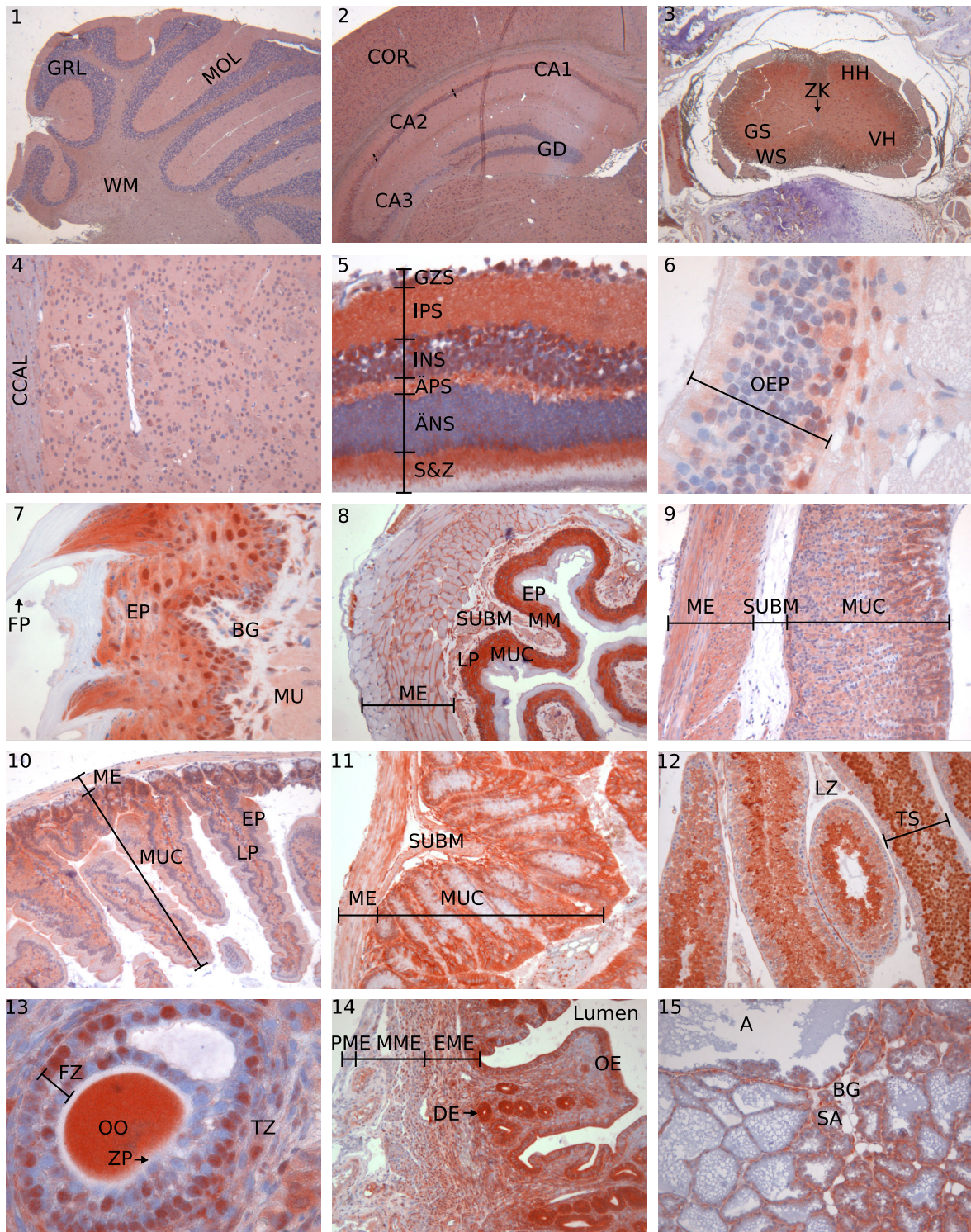
Abbildung 3.6: **Expression von Grx3 in humanen Organen.** RT-PCR auf humane cDNA-Panels der Firma Clontech. Es wurden 16 verschiedene Organe analysiert. Als Negativkontrolle wurde Wasser und als Positivkontrolle gepoolte cDNS aus allen getesteten Organen verwendet. In allen getesteten Organen wurde Grx3 exprimiert.

3.1.2.2 Expression und Lokalisation in Mausorganen

Aus der ubiquitären Expression von Grx3 in humanen Organen konnte lediglich die Präsenz von Grx3 nachgewiesen werden, jedoch keine Rückschlüsse auf die Verteilung des Proteins in den Organen gezogen werden. In immunohistologischen Experimenten mit Mausgewebe sollte daher die Lokalisation in den einzelnen Organen analysiert werden. Um ein möglichst umfassendes Bild der Verteilung von Grx3 zu erhalten, wurden Organe aus den folgenden Bereichen analysiert: Gehirn, Sinnesorgane, Verdauungssystem, lymphatisches System, Reproduktionssystem, endokrines System, urologisches System, metabolisches System, respiratorisches System sowie Muskeln und Haut. Alle Färbungen wurden mit dem polyklonalen affinitätsgereinigten anti-Maus-Grx3-Antikörper durchgeführt. In den Färbungen zeigte sich eine Grx3-Expression in allen Organgruppen. Im Folgenden sind Besonderheiten in der Verteilung der Grx3-Expression aufgelistet:

Im Gehirn wurde Grx3 in allen gezeigten Regionen dem Cerebellum (Abb. 3.7(1)), dem Hippocampus (Abb. 3.7(2)), dem Rückenmark (Abb. 3.7(3)) und dem Striatum (Abb. 3.7(4)) exprimiert. Besonderheiten in der Färbung sind die Zellkernfärbungen in den Pyramidenzellen oder in den Zellkernen des cerebralen Kortex. Im Rückenmark und Striatum waren ebenfalls Kernfärbungen erkennbar. In den Sinnesorganen war Grx3 in Augen- (Abb. 3.7(5)), Nasen- (Abb. 3.7(6)) und Zungengewebe (Abb. 3.7(7)) ebenfalls in Zellkernen lokalisiert. Besonders intensive Färbungen waren sowohl in der inneren und äußeren plexiformen Schicht und den Stäbchen und Zäpfchen des Auges (Abb. 3.7(5)) als auch in den Epithelzellen der Zunge (Abb. 3.7(7)) zu finden. Im Verdauungssystem war Grx3 in Muskelbündeln der Lamina muscularis lokalisiert (Abb. 3.7(8 – 11)). In Organen des männlichen Reproduktionssystems war Grx3 in den Intertestinal- und Sertolizellen lokalisiert. Eine Zellkernfärbung war hier in frühen, runden Spermatiden zu finden (Abb. 3.7(12)). In Organen des weiblichen Reproduktionssystems war eine starke Expression von Grx3 in den Oozyten nachweisbar, die jedoch in

der Zona pellucida komplett fehlte (Abb. 3.7(13)). Die Zona pellucida ist eine Schicht, die die Oozyte von umliegenden Follikelzellen abgrenzt. Im Uterus war Grx3 im Endometrium und in Drüsen- und Oberflächenepithelzellen exprimiert (Abb. 3.7(14)). Im Brustgewebe war Grx3 in den Alveolarzellen zu finden (Abb. 3.7(15)). In metabolischen Organen war Grx3 vor allem um den Bereich der Zentralvene der Leber (Abb. 3.7(16)) und in den Langerhans Inseln des Pankreas lokalisiert (Abb. 3.7(17)). Im Pankreas wiesen die Zellen erneut eine Zellkernfärbung auf. Im urologischen System war Grx3 schwach in den Glomeruli, jedoch stark im proximalen Tubulus exprimiert. Auch hier war eine deutliche Zellkernfärbung erkennbar. Weiter wurde Grx3 im Uroepithel in der Harnblase detektiert (Abb. 3.7(18 und 19)). Im endokrinen System wurde Grx3 in der Nebenniere deutlich exprimiert (Abb. 3.7(20)), während in der Thyroidea keine Expression detektierbar war (Abb. 3.7(21)). In den Atmungsorganen war Grx3 deutlich in den Muskelbündeln der Trachea exprimiert (Abb. 3.7(22)), wohingegen in Lungengewebe fast keine Expression detektierbar war (Abb. 3.7(23)). Im Muskelgewebe war Grx3 sowohl in Herz- (Abb. 3.7(24 und 25)) und in Skelettmuskeln (Abb. 3.7(26 und 27)) deutlich erkennbar. In den Kardiomyozyten war ebenfalls eine deutliche Zellkernfärbung erkennbar. In der Haut war Grx3 hauptsächlich in der Epidermis oder in Zellkernen von Drüsenzellen nachweisbar (Abb. 3.7(28)). In lymphatischen Organen, wie der Milz (Abb. 3.7(29)), war Grx3 stark um die zentrale Arteriole exprimiert. In der Maus ist diese als T-Zell-Zone bekannt, in der T-Zellen mit dendritischen Zellen und durchwandernden B-Zellen interagieren. Außerdem konnte Grx3 in den Germinativen Zentren im Kortex der Lymphknoten nachgewiesen werden (Abb. 3.7(30)) (siehe Abbildung 3.7 und Abschnitt 3.2.3). Interessanterweise wird Grx3 als einziges Protein der Trx-Familie, in den Germinativen Zentren der Lymphknoten exprimiert. Die Germinativen Zentren sind Orte der B-Zellreifung (siehe Abbildung 3.8).



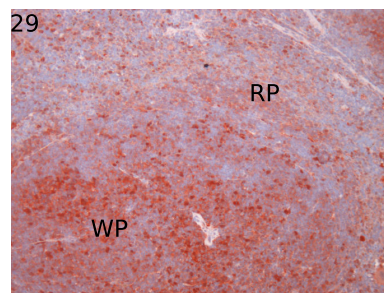
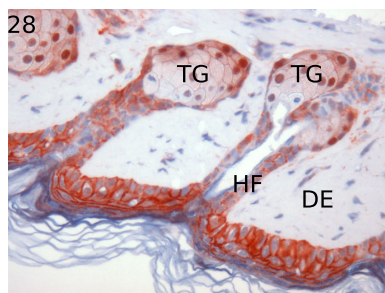
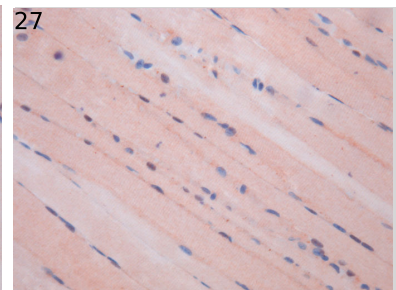
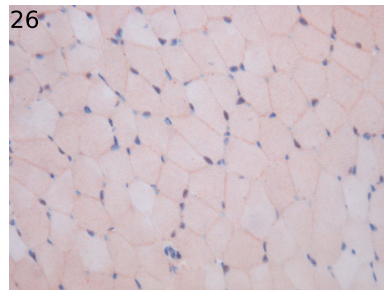
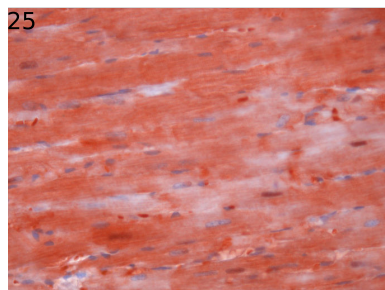
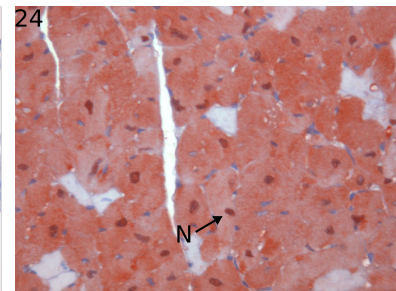
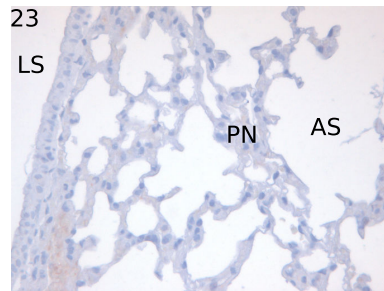
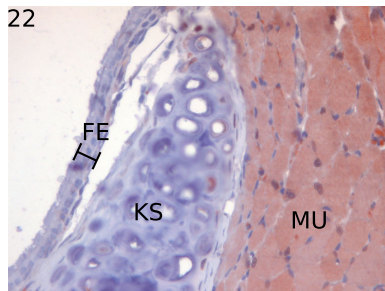
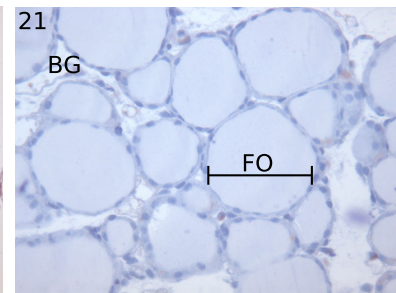
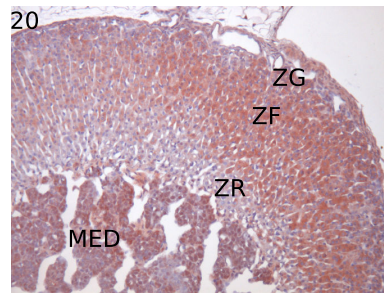
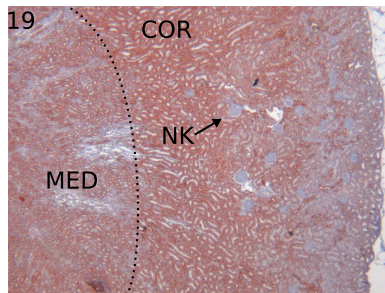
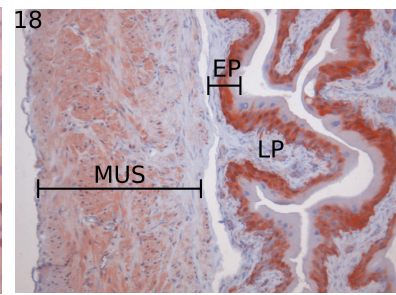
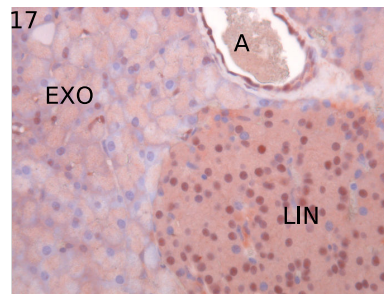
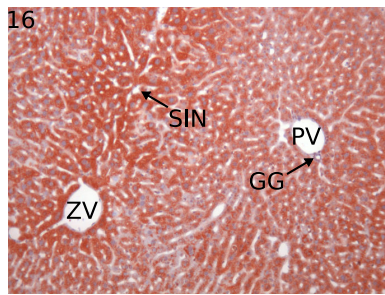


Abbildung 3.7: **Expression von Grx3 in murinen Organen.** Paraffinschnitte wurden mit affinitätsgereinigtem polyklonalem Antikörper gefärbt. Signale wurden nach der Streptavidin-Peroxidase Methode mit AEC als Substrat gefärbt. Die Vergrößerung der Schnitte wird im folgenden mit x gekennzeichnet. 1: Cerebellum 2,5x vergrößert, 2: Hippocampus 2,5x vergrößert, 3: Rückenmark 2,5x vergrößert, 4: Striatum 10x vergrößert, 5: Auge 50x vergrößert, 6: Nase 50x vergrößert, 7: Zunge 20x vergrößert, 8: Ösophagus 10x vergrößert, 9: Magen 10x vergrößert, 10: Ileum 10x vergrößert, 11: Kolon 10x vergrößert, 12: Testis 10x vergrößert, 13: Eizelle 20x vergrößert, 14: Uterus 10x vergrößert, 15: Mamma laktierend 10x vergrößert, 16: Leber 10x vergrößert, 17: Pankreas 20x vergrößert, 18: Harnblase 10x vergrößert, 19: Niere 2,5x vergrößert, 20: Nebenniere 10x vergrößert, 21: Thyroidea 20x vergrößert, 22: Trachea 20x vergrößert, 23: Lunge 20x vergrößert, 24: Herz-Querschnitt 20x vergrößert, 25: Herz-Längsschnitt 20x vergrößert, 26: Skelettmuskel-Längsschnitt 20x vergrößert, 27: Skelettmuskel-Querschnitt 20x vergrößert, 28: Haut 20x vergrößert, 29: Milz 10x vergrößert, 30: Lymphknoten 10x vergrößert. Ausführgang (A), Alveolarsack (AS), äußere nukleäre Schicht (ÄNS), äußere plexiforme Schicht (ÄPS), Bindegewebe (BG), Cornu ammonis 1 – 3 (CA1 – 3), Corpus callosum (CCAL), Cortex (COR), Dermis (D), Drüsenepithel (DE), Endometrium (EME), Epithel (EP), exokriner Pankreas (Exo), Fettgewebe (FG), Filiforme Papillen (FP), Flimmerepithel (FP), Follikel (F), Follikelzellen (FZ), Gallengang (GG), Ganglienzellschicht (GZS), Germinatives Zentrum (GZ), Graue Substanz (GS), Gyrus dentatus (GD), Haarfollikel (HF), Hinterhorn (HH), innere nukleäre Schicht (INS), innere plexiforme Schicht (IPS), Knorpelschicht (KS), Langerhans Insel (Lin), Leydigzellen (LZ), luftleitende Strukturen (LF), Lamina Propria (LP), Lymphfollikel (LF), Mucosa (MUC), Medulla (MED), Muskelbündel (MU), Muskelschicht (MUS), Muskularis externa (ME), Muskularis mucosa (MM), Myometrium (MME), Nierenkörperchen (NK), Nukleus (N), Oberflächenepithel (OE), Olfaktorisches Epithel (OEP), Oozyte (OO), Perimetrium (PME), Pneumozyt (PN), Portalvene (PV), Rote Pulpa (RP), sekretorische Alveole (SA), Sinusoid (SIN), Stäbchen und Zäpfchen (SZ), Stratum granulosum (GRL), Stratum molekulare (MOL), Submucosa (SUM), Talgdrüsen (TG), Thekazellen (TZ), Tubuli seminiferi (TS), Vorderhorn (VH), Weiße Pulpa (WP), Weiße Substanz (WS), Zona Fasciculata (ZF), Zona Glomerulosa (ZG), Zona pellucida (ZP), Zona Reticularis (ZR), Zentralkanal (ZK), Zentralvene (ZV). (Bereits veröffentlicht in Godoy, Funke, Ackermann, Haunhorst et al., 2010 [159].)

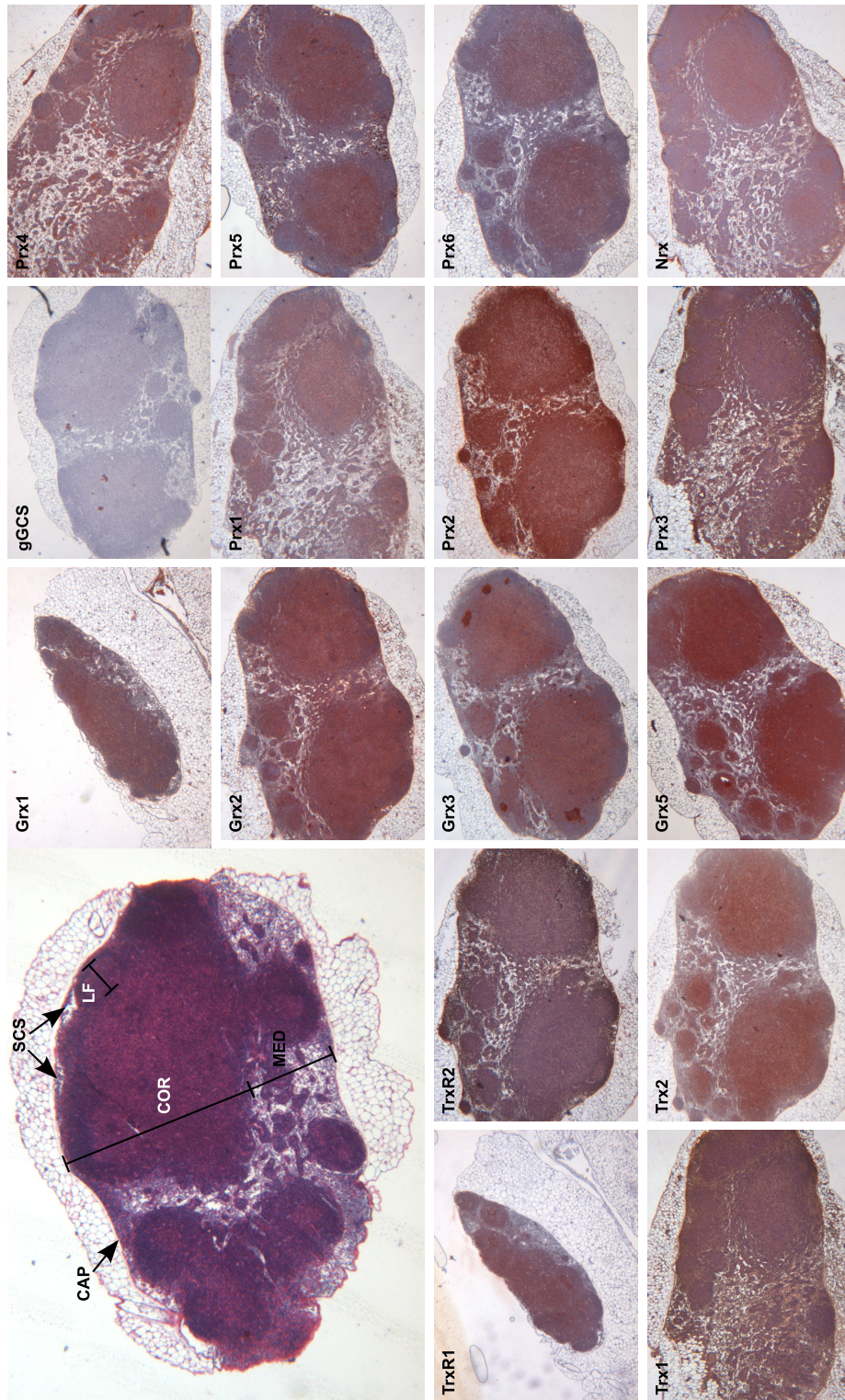


Abbildung 3.8: *Lokalisation von Proteinen der Trx-Familie in Lymphknoten der Maus.* Paraffinschnitte wurden mit polyklonalen Antikörper gefärbt. Signale wurden mit der Streptavidin-Peroxidase Methode mit AEC als Substrat gefärbt. CAP = Kapsel, COR = Cortex, MED = Medulla, LF = lymphatischer Follikel, SCS = subkapsulärer Sinus. Die Abbildungen wurden mit 2,5-facher Vergrößerung aufgenommen (Bereits veröffentlicht in Godoy, Funke, Ackermann, Haunhorst et al., 2010 [159]).

3.1.2.3 Subzelluläre Lokalisation in HeLa-Zellen

Zur Analyse möglicher Funktionen von Proteinen ist die Kenntnis über ihre subzelluläre Lokalisation unerlässlich. In der Literatur wurde für humanes Grx3 bisher ausschließlich eine subzelluläre Lokalisation beschrieben. In den unter Abschnitt 3.1.2.2 durchgeführten Lokalisationsstudien deutete sich eine nukleäre Lokalisation in verschiedenen Mausorganen an. Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von humanem Grx3 wurden immunozytochemische Analysen in HeLa-Zellen durchgeführt. Hierbei zeigte sich neben der bereits beschriebenen zytosolischen Lokalisation auch eine nukleäre Lokalisation von Grx3 (siehe Abbildung 3.9). Hierzu wurden der Pearson- oder Manders-Koeffizient mit der Huygens-Software bestimmt. Der Pearson-Koeffizient deutete mit einem Wert von 0,444 eine partielle Kolo-kalisation mit dem Kern an, die durch die Manders-Koeffizienten $M1 = 1$ und $M2 = 0,893$ bestätigt wurden (siehe Abbildung 3.9). Ein gerichteter Transfer von Grx3 in den Kern war weder nach Stimulation von HeLa-Zellen mit PMA und ebenso nach Behandlung der Zellen mittels Hypoxie oder Hypoxie und anschließender Reoxygenierung beobachtbar gewesen.

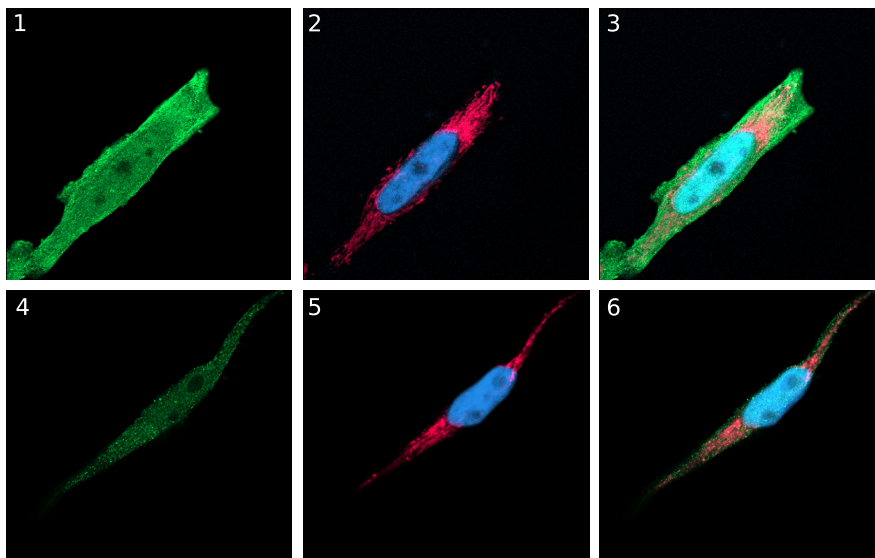


Abbildung 3.9: **Subzelluläre Lokalisation von Grx3 in HeLa-Zellen.** Immunozytochemische Analyse von Grx3 zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation in HeLa-Zellen. 1 bis 3: HeLa-Zellen wurden dreimal im Abstand von drei Tagen mit Kontroll-siRNA transfiziert. Zellen in 4 bis 6 wurden analog mit siGrx3(TS1) siRNA transfiziert. 1 und 4: Färbungen von Grx3; 2 und 5: Mitochondrien (mit MitoTracker Deep Red 633)- und Kernfärbung (mit DAPI); 3 und 6: Überlagerungen von Grx3, Kern und Mitochondrien. Grün: Grx3; rot: Mitochondrien ; blau: Kern.

3.1.3 Glutaredoxin 3 besitzt einen Cofaktor

3.1.3.1 Koordination eines Eisenschwefelzentrums

Die anaerobe Reinigung von humanem Grx3 nach bakterieller Überexpression in *E.coli* resultierte in einer gelblich-braunen Proteinsuspension, wie sie auch bei der Reinigung von Grx2 vorzufinden ist [91]. Diese Beobachtung lässt die Präsenz eines eisenhaltigen Kofaktors in Grx3 vermuten. Für eine genauere Analyse wurde anaerob gereinigtes Grx3 mittels Gelfiltrationschromatographie aufgetrennt. Hierbei bildeten sich zwei Fraktionen. Zunächst eluierte Grx3 mit einer Größe von 87,8 kDa und zusätzlich konnte Grx3 mit einer Größe von 44,1 kDa bestimmt werden. Die experimentell ermittelten Werte stimmen im Rahmen der Messgenauigkeit mit den theoretisch errechneten Werten für monomeres Grx3 (39,6 kDa) und dimerisiertes Grx3 (etwa 79,2 kDa) überein. Eine Analyse mittels UV/Vis-Spektroskopie ergab in der Dimerfraktion Absorptionsbanden bei 324, 412, 510 und 590 nm, die charakteristisch für [2Fe-2S]-Zentren sind. Die Absorptionsbanden waren in den Monomerbanden nicht detektierbar (siehe Abbildung 3.10).

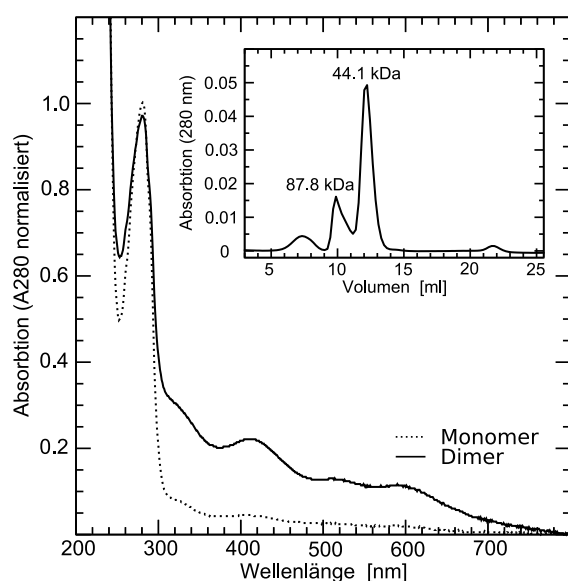


Abbildung 3.10: **Identifizierung eines eisenhaltigen Kofaktors in Grx3.** UV/Vis-Absorptionsspektrum von gereinigtem Grx3 nach Expression in *E. coli* und Gelfiltrationschromatographie (Bildeinsatz). Die Werte wurden auf die Absorption bei 280 nm normalisiert. Dimerfraktion: durchgezogene Linie, Monomerfraktion: gepunktete Linie.

Zur Aufklärung der Eigenschaften des in Grx3 koordinierten Kofaktors wurde Grx3 in Anwesenheit von ^{57}Fe in Minimalmedium in *E. coli* exprimiert und mittels Mößbauerspektroskopie analysiert. Das dominante Spektrum (40 %) zeigte eine Isomerverschiebung bei $0,273 \text{ mms}^{-1}$ und eine Quadrupol-Aufspaltung von $0,622 \text{ mms}^{-1}$ (siehe Abbildung 3.11 A). Diese Werte waren charakteristisch für Eisen(III) in einer tetrahydralen Schwefelgeometrie. Folglich könnte es sich bei dem Kofaktor um ein [1Fe-4Cys]-, ein [2Fe-2S]- oder ein [3Fe-4S]-Zentrum handeln.

Mittels EPR-spektroskopischer Analysen wurde eine weitere Möglichkeit geliefert, die Zu-

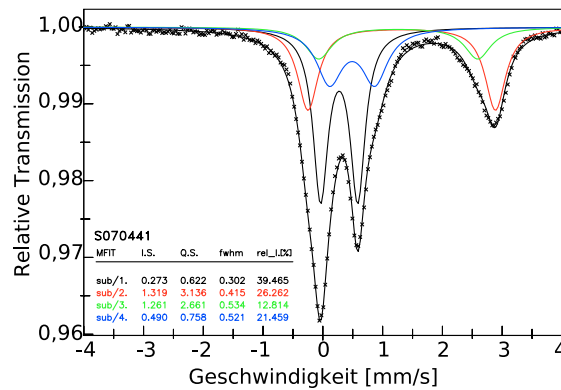
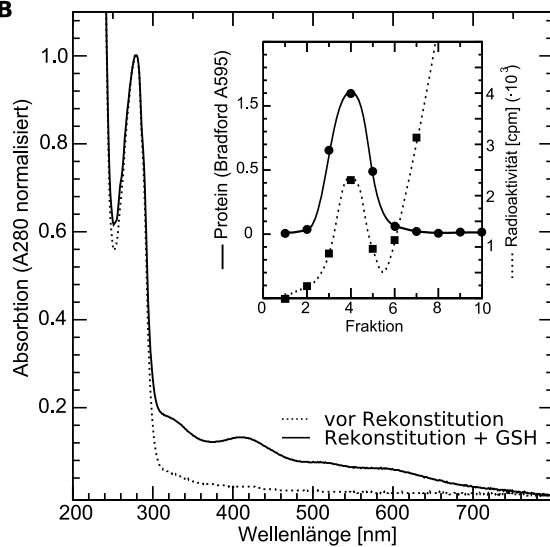
A**B**

Abbildung 3.11: **Identifizierung von GSH-abhängigen [2Fe-2S]-Zentren in Grx3.** **A:** Mößbauerspektrum bei 80 K. Die Überlagerung von vier Subspektren ergibt eine gute Anpassung an die Messwerte. Subspektrum 1 (schwarz) typisches Spektrum für Fe^{3+} in einer tetrahydralen Schwefelgeometrie, Subspektrum 2 (rot) zeigt unspezifisch gebundenes Eisen und Subspektren 3 (grün) und 4 (blau): metabolisiertes Eisen. **B:** UV/Vis-Absorptionsspektren vor (gepunktete Linie) und nach (durchgezogene Linie) Rekonstitution von Fe/S-Zentren. Die Spektren wurden auf die Absorption bei 280 nm normiert. Bildeinsatz: Chromatogramm nach *in vitro* Rekonstitution von Grx3 in Anwesenheit von radioaktiv markiertem GSH. Durchgezogene Linie: Proteingehalt, Gepunktete Linie: Radioaktivität. (Bereits veröffentlicht in Haunhorst et al.; 2010; [164].)

sammensetzung des Fe/S-Zentrums näher zu beschreiben. Bei der EPR-Spektroskopie kann zwischen paramagnetischen (ungepaarte Elektronen) und diamagnetischen (gepaarte Elektronen) unterschieden werden. Bei den drei aus der Mößbauerspektroskopie verbleibenden Möglichkeiten handelt es sich bei dem [1Fe-4Cys]- und dem [3Fe-4S]-Zentrum um paramagnetische Zentren, während das [2Fe-2S]-Zentrum ein diamagnetisches Zentrum ist. Da in der Elektronenresonanz (EPR)-Spektroskopie kein Signal detektiert werden konnte (bereits veröffentlicht in Haunhorst et al., 2010 [164]), musste das Zentrum diamagnetisch sein. Folglich wurde ein $[\text{2Fe-2S}]^{2+}$ Zentrum koordiniert. Für eine genauere Analyse des Fe/S-Zentrums wurde ein *in vitro* Rekonstitutions-Assay etabliert. Nach Rekonstitution von Grx3 waren die Absorptionsbanden bei 342, 412, 510 und 590 nm und damit ein Fe/S-Zentrum detektierbar (siehe Abbildung 3.11 (B)). Rekonstitutionen in An- und Abwesenheit von GSH zeigten, dass GSH essentiell für die Koordination des Zentrums ist. Bei einer Rekonstitution mit radio-

aktiv markiertem GSH koeluierte das radioaktiv markierte GSH in einer Fraktion mit dem Holo-Grx3-Komplex nach Gelchromatographie (Abbildung 3.11 B). Nach Mutagenese beider Cysteine im aktiven Zentrum zu Serin (C159S; C216S) zeigte sich nach anaerober Reinigung, dass die Mutanten kein Fe/S-Zentrum bilden (Daten nicht gezeigt).

3.1.4 Quantifizierung der Eisenschwefelzentren

Aufgrund der beiden monothiol Grx Domänen könnte Grx3 durch Bildung von einem oder zwei Fe/S-Zentren dimerisieren (siehe schematische Abbildung 3.12). Durch die kolorimetrische Bestimmung der Menge an gebundenem Eisen [154] (Durchführung: siehe Material und Methoden 2.2.6.11) und einem kolorimetrischen Nachweis von Schwefel (Durchführung: siehe Material und Methoden 2.2.6.12 an gereinigtem und rekonstituiertem Grx3 konnte gezeigt werden, dass Grx3 $2,08 \pm 0,29$ Fe/Monomer und $2,63 \pm 0,17$ S²⁻/Monomer bindet. Hieraus deutete sich eine Dimerisierung von Grx3 durch Koordination von zwei [2Fe-2S]-Zentren an, wodurch nur eine Dimerisierung durch 2[2Fe-2S]-Zentren möglich ist (siehe Abbildung 3.12).

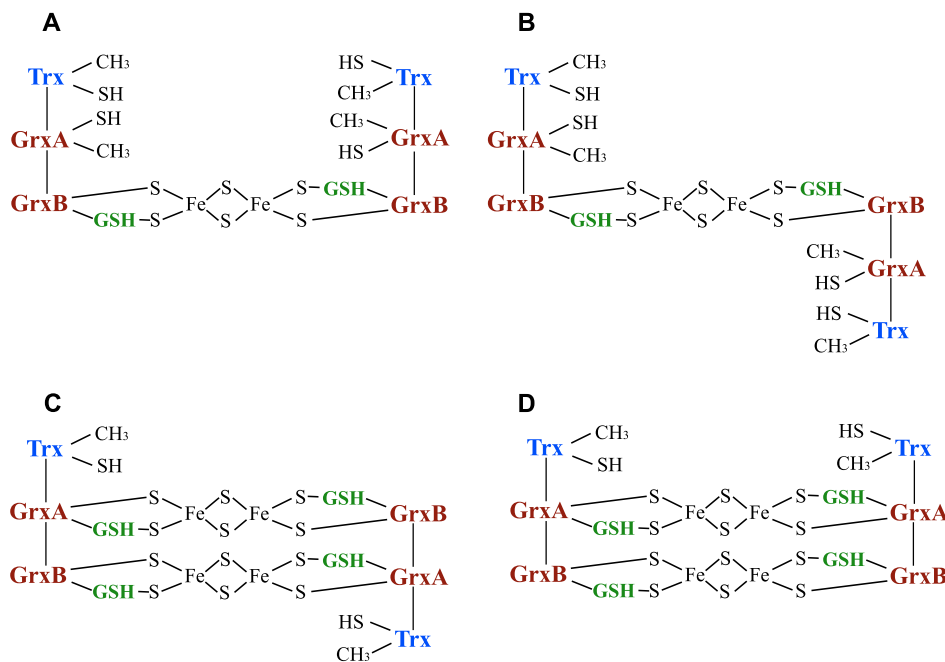


Abbildung 3.12: **Schematische Darstellung der Koordination von Fe/S-Zentren durch Grx3.** Modell des dimerisierten Grx3-Komplexes. (A) und (B) Grx3 dimerisiert durch die Koordination von je einem Fe/S-Zentrum. (C) Dimerisierung von Grx3 durch die Koordination von 2 Fe/S-Zentren.

Für die abschließende Quantifizierung der durch Grx3 koordinierten Fe/S-Zentren wurden Deletionsmutanten von Grx3 unter anaeroben Bedingungen gereinigt. Für die Reinigung wurden entweder Einzeldomänen (Trx, GrxA oder GrxB) oder Domänenpaare (Trx-GrxA und GrxA-GrxB) verwendet. Die Trx-Domäne wies kein Fe/S-Zentrum auf, während die beiden Grx-Domänen je ein Fe/S-Zentrum koordinieren konnten. Nach Normalisierung der Absorption bei 280 nm zeigte sich, dass die Summe der Absorptionen der beiden Grx-Einzeldomänen den Werten des Wildtyp-Proteins bzw. der GrxA-GrxB-Mutante entsprach. Folglich koordinierte Grx3 zwei [2Fe-2S]-Zentren (siehe Abbildung 3.13).

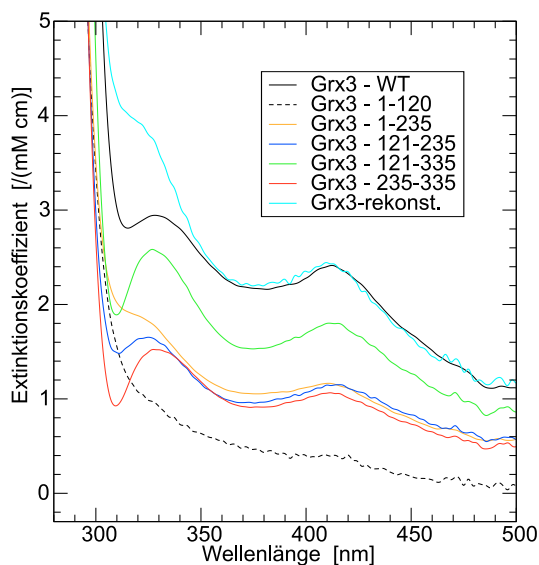


Abbildung 3.13: **Quantifizierung der Fe/S-Zentren in Grx3-Deletionsmutanten.** UV/Vis-Absorptionsspektren von individuellen Grx3-Domänen und des WT-Proteins, normiert auf die Absorption bei 280 nm. Durchgezogene schwarze Linie: Grx3-WT, gestrichelte schwarze Linie: Trx-Domäne, gelb: Trx-GrxA-Domäne, blau: GrxA-Domäne, grün: GrxA-GrxB-Domänen, rot: GrxB-Domäne und türkis: rekonstituiertes Grx3-Protein. Bereits veröffentlicht in Haunhorst et al., 2010; [164].

3.1.5 Stabilität des Holo-Grx3-Komplexes

In der Literatur wurde vermutet, dass Grx3 ROS-vermittelte Funktionen in der Signaltransduktion übernimmt. Dies deutete einen Effekt von Redoxsignalen auf das Protein an [104]. Durch verschiedene Behandlungen von Grx3-Dimeren, durch Reduktion mit GSH oder durch Auslösen von oxidativem Stress (H_2O_2) bzw. in Anwesenheit des NO^\cdot -donor S-nitroso Glutathion (GSNO) oder durch Behandlung mit einem Ein-Elektronen-Oxidants, sollte der Einfluss äußerer Faktoren auf die Stabilität des Fe/S-Zentrums simuliert werden.

Unter aeroben Bedingungen dissoziierte der Holo-Komplex innerhalb von zwei Stunden. Die Stabilisierung des Holo-Komplexes durch GSH war nur sehr schwach. H_2O_2 hatte keinen Einfluss auf die Stabilität des Fe/S-Zentrums während der Ein-Elektron-Oxidant Ferricyanid und der NO^\cdot -donor GSNO die Dissoziation des Holo-Komplexes deutlich beschleunigten (siehe Abbildung 3.14).

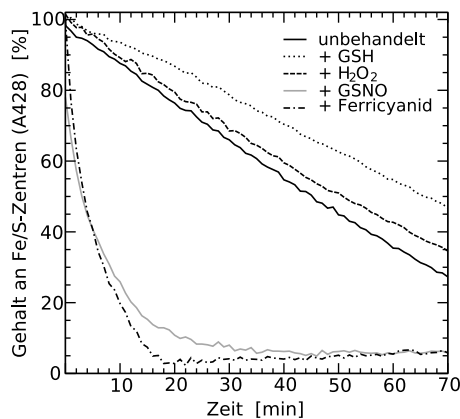


Abbildung 3.14: **Stabilität des Fe/S-Zentrums in Grx3.** Die Stabilität des frisch gereinigten humanem Grx3-Holo Komplexes (180 μ M) wurde unter aeroben Bedingungen bestimmt. Gemessen wurde die Abnahme der Absorption bei 420 nm. Das Protein wurde mit 1 mM GSH, 1 mM H₂O₂, 1 mM GSNO oder 0,5 mM Ferricyanid behandelt.

3.1.6 *In vivo* Koordination des Eisenschwefelzentrums

Alle bisherigen Experimente wurden ausschließlich *in vitro* bzw. mit rekombinant exprimiertem Protein durchgeführt. Um zu zeigen, dass Grx3 auch *in vivo* Fe/S-Zentren koordiniert, wurde Grx3 zum Erhalt der Fe/S-Zentren mittels Immunopräzipitation unter anaeroben Bedingungen gereinigt. Durch diese Vorgehensweise konnte sichergestellt werden, dass die unter Sauerstoff labilen Fe/S-Zentren erhalten blieben.

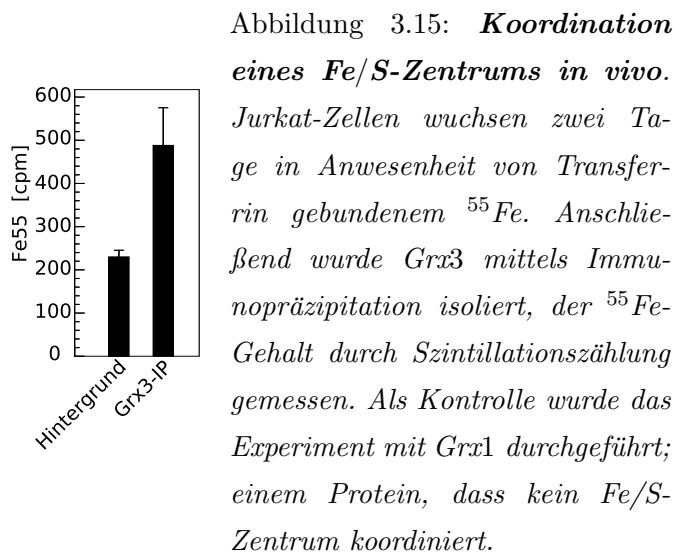


Abbildung 3.15: **Koordination eines Fe/S-Zentrums *in vivo*.** Jurkat-Zellen wuchsen zwei Tage in Anwesenheit von Transferrin gebundenem ⁵⁵Fe. Anschließend wurde Grx3 mittels Immunopräzipitation isoliert, der ⁵⁵Fe-Gehalt durch Szintillationszählung gemessen. Als Kontrolle wurde das Experiment mit Grx1 durchgeführt; einem Protein, dass kein Fe/S-Zentrum koordiniert.

Für dieses Experiment wuchsen - Jurkat-Zellen zwei Tage in Anwesenheit von Transferrin gekoppeltem ⁵⁵Fe. Nach anschließender Lyse der Zellen unter anaeroben Bedingungen und einer Co-IP, die ebenfalls unter anaeroben Bedingungen durchgeführt wurde, konnte nach einigen Waschschritten an den Antikörper-Antigen gebundenen Komplex gebundenes Eisen mittels Szintillationszählung detektiert werden. Hierbei zeigte sich, dass im Ver-

gleich zu Kontrollseren signifikant mehr ⁵⁵Fe gebunden war, was auf die Koordination eines Fe/S-Zentrum *in vivo* hindeutete (Abbildung 3.15). Aufgrund des Signal- zu Hintergrundverhältnisses konnte jedoch keine Quantifizierung der Fe/S-Zentren durchgeführt werden.

3.2 Funktionen von Grx3 in vivo

Bisher wurde Grx3 *in vivo* eine Funktion in der Aktivierung von T-Zellen [94] oder in der Herzhypertrophie [106,165] zugesprochen.

3.2.1 Eine Depletion von Grx3 führt zu Veränderungen der Genexpression

Durch die Analyse der differentiellen Genexpression von WT-HeLa-Zellen im Vergleich mit HeLa-Zellen mit reduzierter Grx3 Expression sollten weitere Prozesse identifiziert werden, für die Grx3 physiologisch relevant ist. Für diesen Ansatz wurde die Microarray-Technologie verwendet. Da in der Literatur eine Interaktion von Grx3 mit der PKC θ nach T-Zellaktivierung mittels 100 ng/ml PMA bereits beschrieben wurde [94], wurden mit Phorbol ester stimulierte HeLa-Zellen für die Microarray-Analyse verwendet. Hierfür wurden HeLa-Zellen zweimal in einem Abstand von drei Tagen mit siGrx3(TS1)- und Kontroll-siRNA transfiziert. Zwei Tage nach der letzten Transfektion wurden die transfizierten HeLa-Zellen für 24 Stunden mit 100 ng/ml PMA behandelt. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass sich nach einer Doppel-

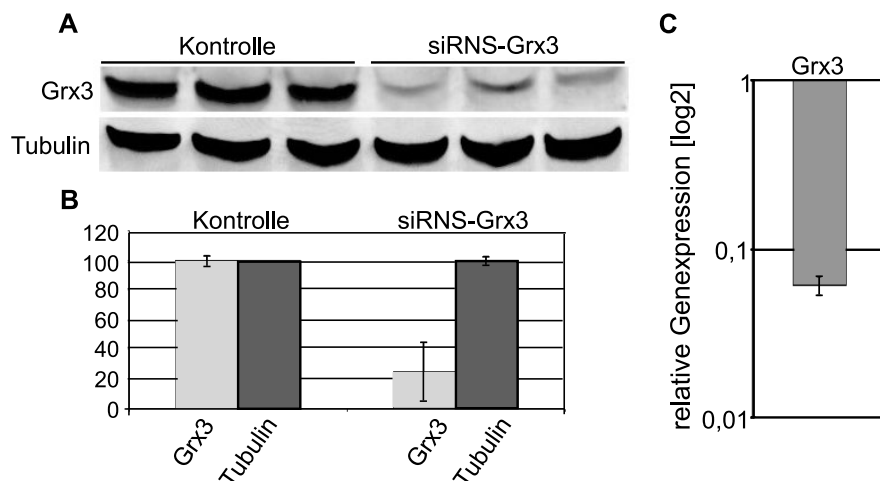


Abbildung 3.16: **Reduktion der Grx3 Expression nach Elektroporation von spezifischer siRNA.** HeLa-Zellen wurden im Abstand von drei Tagen zweimal mit siGrx3 (TS1)- oder Kontroll-siRNA transfiziert. (A) Kontrolle der Transfektion mittels Westernblot. Es wurden 25 μ g Zelleextrakt aufgetragen und mit Grx3- oder Tubulin- spezifischen Antikörpern gefärbt. (B) Densitometrische Analyse des Westernblots aus A. (C) Q-RT-PCR-Analyse der Reduktion von Grx3 in den verwendeten Proben ($n = 3$; SEM).

transfektion von HeLa-Zellen mit siGrx3(TS1)- oder Kontroll-siRNA und einer 10-minütige Behandlung mit 100 ng/ml Phorbol ester zahlreiche Unterschiede auf Proteinebene abzeichne-

ten. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde eine Westernblotanalyse (Abbildung 3.16 A und B) und eine Q-RT-PCR-Analyse (Abbildung 3.16 C) durchgeführt. Für die Überprüfung wurden drei voneinander unabhängige Ansätze gewählt. Hierbei zeigte sich eine deutliche Reduktion von Grx3 um 76 % auf Protein- und um 94 % auf Transkriptionsebene in den transfizierten Zellen (siehe Abbildung 3.16).

In Abbildung 3.17 ist ein schematischer Verlauf der Microarray-Analyse gegeben. Es werden die verwendeten Programme genannt und alle Kapitel in denen Ergebnisse des Arrays gezeigt oder diskutiert werden, erwähnt.

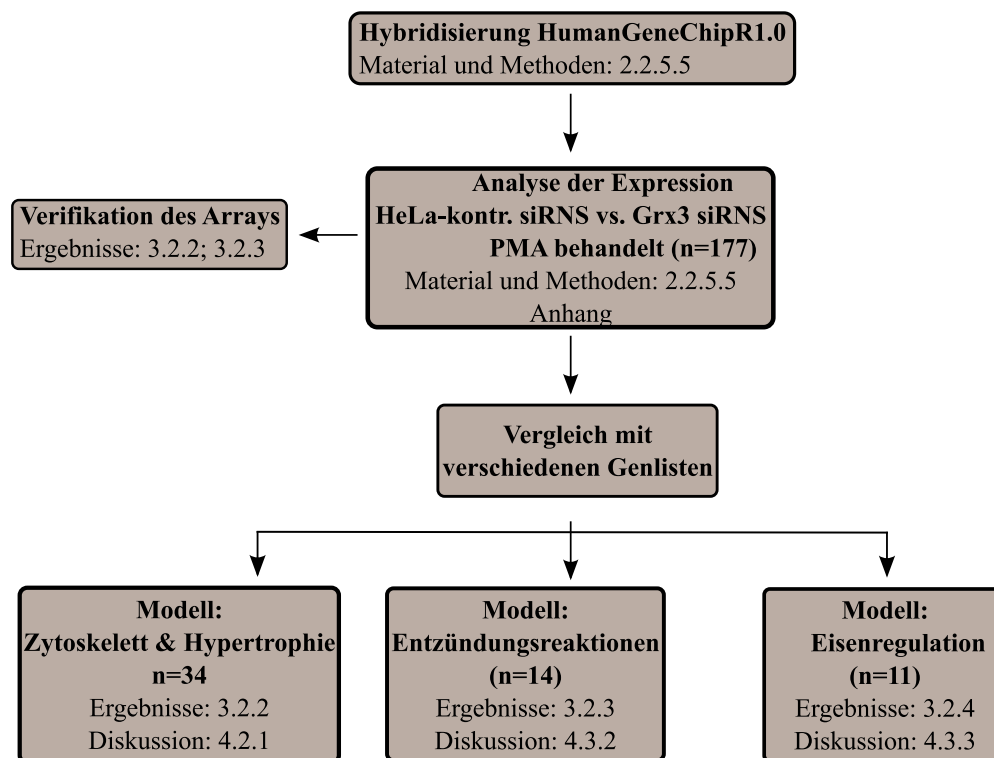


Abbildung 3.17: **Auswertung der Microarray-Analyse.** Schematische Gliederung der Auswertung des Microarrays und seine Verknüpfung in dieser Dissertation. Berücksichtigt wurden signifikante Änderungen zwischen Δ_{pos} von 0,54 und Δ_{neg} von $-0,5$ (siehe Anhang).

3.2.2 Eine Depletion von Grx3 führt zu Änderungen im Zytoskelett

In der hier durchgeführten Microarray-Analyse konnten 34 Gene identifiziert werden, denen Funktionen in der Organisation des Zytoskeletts oder genauer der Aktin und Tubulin Organisation, der Formation von Lamellopodien oder der fokalen Adhäsion zugeschrieben werden können (siehe Tabelle 3.1). Eine Validierung der Ergebnisse erfolgte mittels Q-RT-PCR für

ausgewählte Gene: Integrin A2 als Protein der fokalen Adhäsion, ICAM1 als Protein mit Funktionen in der Zelladhäsion, Dock4 und Cofilin als Mediatoren in der Aktindynamik und Tropomyosin 2 einem aktinbindendem Protein im Sarkomer des Herzens (siehe Abbildung 3.18). Eine zusätzliche Validierung der Microarrayergebnisse erfolgte durch die Untersuchung des Phänotyps oder des Migrationsverhalten der Zellen.

Tabelle 3.1: Transkripte mit differentieller Genexpression nach Reduktion des Grx3-Levels: Bezug zum Zytoskelett. Die Gene in den grau hinterlegten Spalten wurden mittels einer Q-RT-PCR verifiziert.

Abkürzung	Name	GenID	Änderung (log2)
MXRA5	matrix-remodelling associated 5	25878	2,55
KRT17	Keratin17	3872	2,48
MYLK3	Myosin light chain kinase 3	91807	2,35
KRT80	Kreatin 80	14459	2,22
THBS1	Thrombosporin 1	7057	2,1
CFL2	Cofilin 2	1073	2,03
ANKRD1	Ankyrin repeat domain 1	27063	2
PDGFRB	Platelet-derived growth factor receptor beta polypeptide	5159	1,93
FBN2	Fibrillin 2	2201	1,92
HSPG2	Heparan sulfate proteoglycan 2	3339	1,87
TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2	7077	1,84
ITGA2	Integrin A1	3673	1,82
JUB	jub, ajuba homolog (Xenopus laevis)	84962	1,79
CAV1	Caveolin 1 Caveolae protein	857	1,78
SDC2	Syndecan-2	6383	1,77
KIF13A	Kinesin family member 13A	63971	1,76
TPM2	Tropomyosin 2	7169	1,74
CLTCL1	clathrin, heavy chain-like 1	8218	1,64
SLPI	secretory leukocyte peptidase inhibitor	6590	0,61
DOCK7	dedicator of cytokinesis 7	85440	0,6
PLEK2	Plekstrin 2	26499	0,6
DCBLD2	Discoidin, CUB and LCCL domain containing 2	131566	0,59

FERMT1	Fermitin family homolog 1 (Drosophila)	55612	0,58
STK38L	Serin/threonin Kinase 38 like	23012	0,57
DOCK4	dedicator of cytokinesis 4	9732	0,57
VEGFC	vascular endothelial growth factor c	7424	0,57
FGD4	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 4	121512	0,56
ICAM1	intracellular adhesion molecule 1	3383	0,56
MPZL2	Myelin protein zero-like 2	10205	0,56
SEMA4B	sema domain, immunoglobulin 4B	10509	0,56
SDC4	Syndecan-4	6385	0,55
ITGB4	Integrin beta 4	3691	0,51
ITGA2	Integrin alpha 2	3673	0,43
Grx3	Glutaredoxin 3	10539	0,15

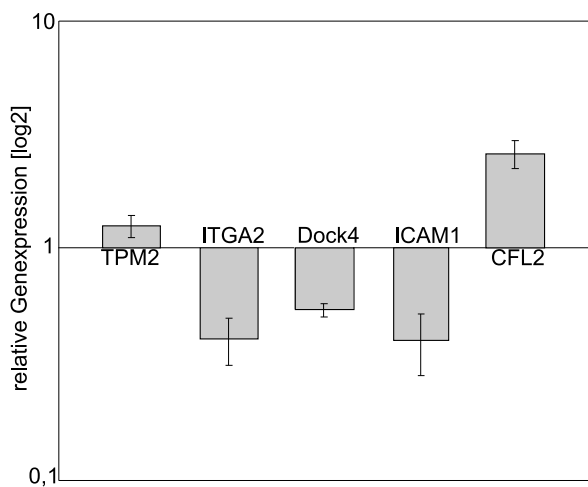


Abbildung 3.18: **Validierung der Microarrayergebnisse.** Q-RT-PCR zur Verifikation von Genen mit Einfluss auf das Zytoskelett ($n = 3$; SEM) in logarithmischer Darstellung. Die Q-RT-PCR wurde unabhängig vom Microarray durchgeführt.

Durch die Microarrayanalyse können lediglich Hinweise auf eine mögliche Involvierung in zytoskeletale Prozesse gewonnen werden, deshalb sollte im weiteren Verlauf der Einfluss von Grx3 auf die Organisation des Zytoskeletts detaillierter betrachtet werden. Hierzu wurde zunächst eine fluoreszenzmikroskopische Analyse durchgeführt. In HeLa-Zellen mit einem reduzierten Grx3-Level und Wildtyp-HeLa-Zellen wurde Tubulin mit einem spezifischen Antikörper, Aktin mit Phalloidin und Zellkerne mit DAPI visualisiert. Die mikroskopische Analyse zeigte, dass eine Reduktion des Grx3-Levels in der Zelle leichte Veränderungen der Zellform im Vergleich mit Kontrollzellen zur Folge hatte (siehe Abbildung 3.19). In Abwesenheit von Grx3 zeigte sich eine Verschiebung der Aktinfilamente in die Peripherie der Zelle, während in

der Mikrotubuliverteilung keine Unterschiede detektierbar waren. Deutlichere Unterschiede wurden in Bezug auf eine Elongation der Zellen und im Übereinanderwachsen der Zellen bei Abwesenheit von Grx3 detektiert. Die Kontrollzellen wuchsen adhärent als Monolayer, mit einer für HeLa-Zellen typischen Eigenschaften. Demhingegen wiesen HeLa-Zellen mit einem reduzierten Grx3-Proteinlevel verlängerte Zellausläufer auf, da sie sich im Gegensatz zu den Kontrollzellen kreuzen konnten (siehe Abbildung 3.19).

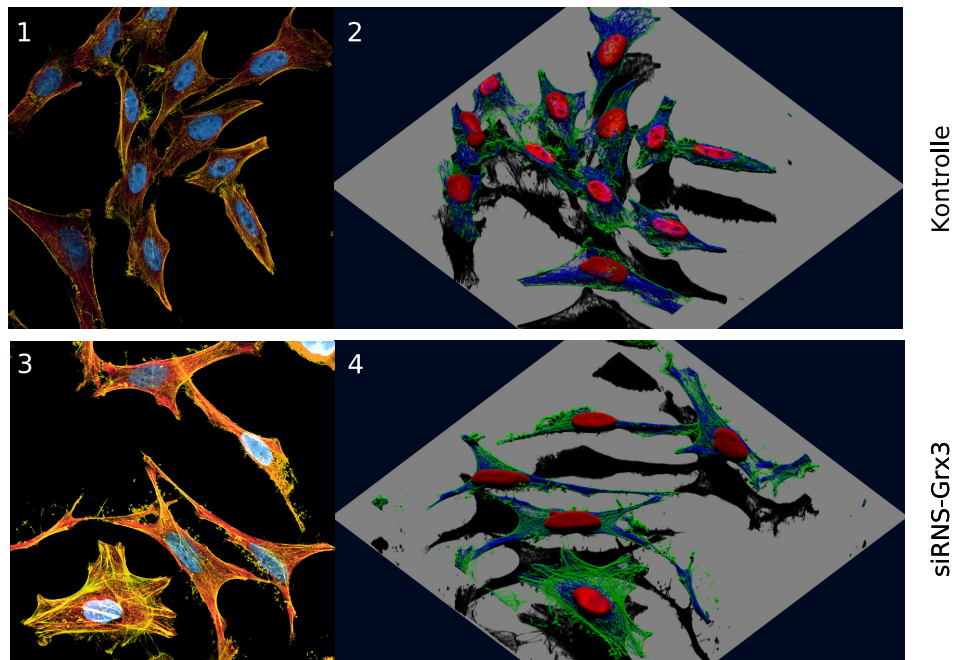


Abbildung 3.19: **Phänotyp von HeLa-Zellen in An- und Abwesenheit von Grx3.** In 1 und 2 wurden HeLa-Zellen mit Kontroll-siRNA transfiziert, in 3 und 4 wurden sie mit Grx3-siRNA transfiziert. 1 und 3 zeigen jeweils eine mit dem konfokalen Mikroskop aufgenommene Ebene (blau: Kern; gelb: Aktin; orange: Tubulin); 2 und 4 sind dreidimensionale Rekonstruktionen mehrerer konfokaler Ebenen nach Dekonvolution (rot: Kern; grün: Aktin; blau: Tubulin).

Um die Ergebnisse zu verifizieren, wurde eine Migrationsanalyse durchgeführt. Hierzu wurden HeLa-Zellen zweimal in einem Abstand von drei Tagen transient mit Grx3(TS1) siRNA oder mit Kontroll siRNA transfiziert. Drei Tage nach der letzten Transfektion wurden die Zellen in 'ibidi Kammern' für einen *scratch-assay* ausgesät, so dass sie nach 24 Stunden konfluent waren. Die Messung wurde gestartet, indem ein eingesetzter Plastikstreifen entfernt und so ein Spalt von exakt 500 μm Breite erzeugt wurde. Im Abstand von vier Stunden wurden Bilder mit einem Phasenkontrastmikroskop aufgenommen, anhand derer die verbleibende Spaltbreite bestimmt werden konnte. Bei einem täglichen Wechsel des Mediums zeigten sich

keine Unterschiede zwischen den beiden Zellpopulationen. Wurde das Medium hingegen nicht gewechselt, migrierten die Zellen mit einem reduzierten Grx3-Level schneller als die Zellen mit dem endogenen Level an Grx3 (siehe Abbildung 3.20).

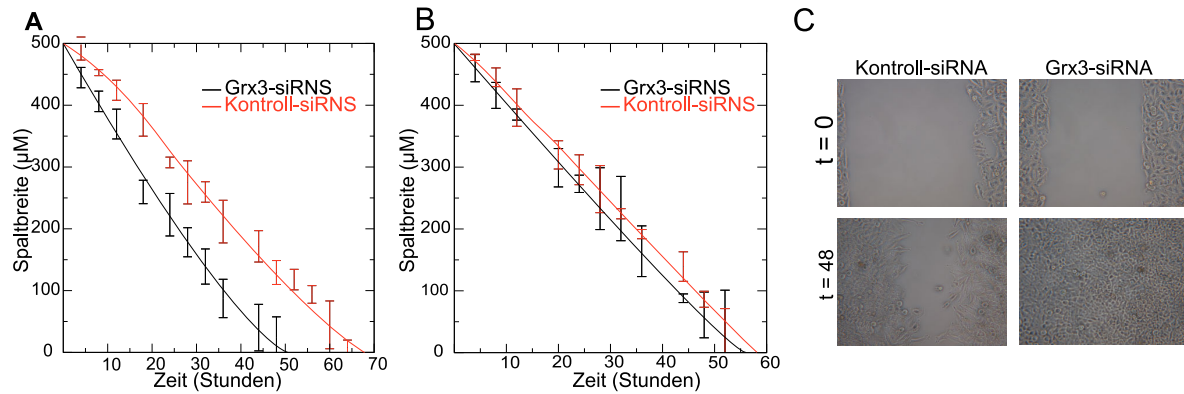


Abbildung 3.20: **Migrationsverhalten von HeLa-Zellen in An- und Abwesenheit von Grx3.** (A) Migrationsverhalten von transfizierten HeLa-Zellen ohne Mediumwechsel. (B) Migrationsverhalten der HeLa-Zellen, wenn alle 24 Stunden das Medium gewechselt wurde. (C) Phasenkontrastaufnahmen des Spaltes.

3.2.3 Eine Depletion von Grx3 führt zu Änderungen einer differentiellen Expression von Genen inflammatorischer Reaktionen

Die PKC nimmt eine Funktion im T-Zell-Rezeptor (TCR)-Signaling ein [166], so kann die PKC Isoform θ zu einer selektiven Aktivierung des c-Jun N-terminalen Kinase (JNK)/AP-1-Signalweges und der Interleukin-2 Genen in T-Zellen führen [167–169]. Ebenfalls kann die PKC θ mit dem TCR-Komplex und den Kontaktstellen zwischen antigenspezifischen T-Zellen und antigen präsentierenden Zellen kolokalisieren [170] und dort einen Teil des supramolekularen Aktivierungszentrums ausbilden.

Bereits in 2000 konnte durch Witte und Koarbeiter gezeigt werden, dass Grx3 in T-Zellen exprimiert wird und dort mit der PKC θ kolokalisiert [94]. In der Literatur wird derzeit kontrovers argumentiert, ob die Regulation der PKC θ durch eine direkte Protein-Protein-Interaktion [94] oder als Sekundäreffekt vermittelt wird [171]. Nach transients Überexpression der PKC θ und von Grx3 konnte eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen gezeigt werden [94]. In den hier durchgeführten Co-Immunopräzipitationen konnte auch bei Erhöhung der verwendeten PMA-Konzentration und einer Verlängerung der Inkubationszeit keine Interaktion zwischen den beiden Proteinen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.21).

Die hier durchgeführte Microarrayanalyse nach Reduktion des endogenen Grx3-Levels und

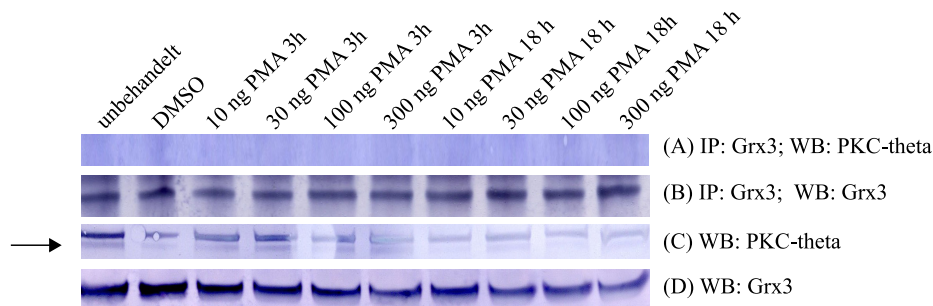


Abbildung 3.21: **Interaktionsanalyse zwischen Grx3 und PKC θ** . Jurkat-Zellen wurden mit 10, 30, 100 oder 300 ng PMA/ml 3 respektive 18 Stunden behandelt. Die Proteinextrakte wurden wie folgt analysiert: (A) Das Eluat einer Immunopräzipitation gegen Grx3 wurde für eine Westernblotanalyse zum Nachweis der PKC θ verwendet. (B) Kontrolle der Eluate der Immunopräzipitation aus A auf Grx3, (C, D) Kontrolle der Proteinextrakte auf PKC θ und Grx3 mittels Westernblotanalyse (WB).

24-stündiger Stimulation mit 100 ng/ml PMA zeigte im Vergleich zu stimulierten Kontrollzellen eine Veränderung in der Genexpression von 12 Genen (siehe Tabelle 3.2), die an den unterschiedlichsten Stellen in die Entstehung bzw. der Regulation von Entzündungsreaktionen involviert sind. Exemplarisch wurden Expressionsänderungen der folgenden Gene mittels Q-RT-PCR geprüft: die beiden dual-spezifischen Phosphatasen DUSP4 (Zellkern) und DUSP6 (Zytoplasma), die der Regulation von MAP-Kinasen (z.B. ERK) dienen sowie ICAM1, einem Faktor der für die Anheftung von Leukozyten an das Endothel verantwortlich ist und der Hämoxygenase-1 (HO-1), einem hämspaltenden Enzym (siehe Abbildung 3.22). In der Q-RT-PCR-Analyse konnten fast alle differentiellen Genexpressionen, die in der Microarrayanalyse detektiert wurden, bestätigt werden. Die einzige Ausnahme stellte c-Fos dar.

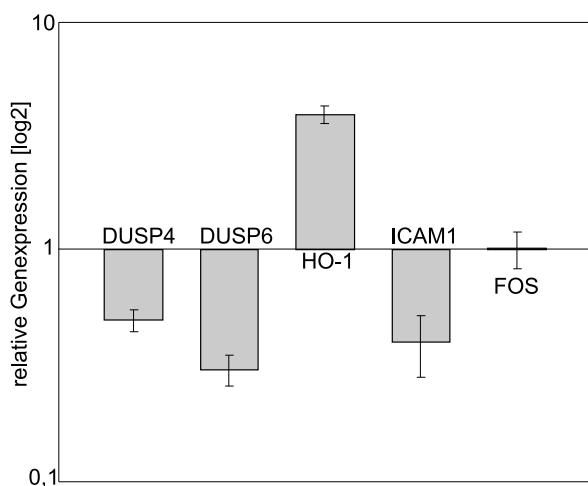


Abbildung 3.22: **Validierung der Microarrayergebnisse**. Q-RT-PCR zur Verifikation von Genen mit Einfluss auf inflammatorische Prozesse ($n = 3$; SEM) in logarithmischer Darstellung.

Tabelle 3.2: Transkripte mit einer differentiellen Genexpression nach Reduktion des Grx3-Levels bei Behandlung der Zellen mit PMA: Bezug zu Entzündungsreaktionen. Die Gene in den grau hinterlegten Spalten wurden mittels einer Q-RT-PCR verifiziert.

Abkürzung	Name	GenID	Änderung (log2)
HO-1	Heme oxygenase 1	3162	2,43
TIMP2	TIMP metalloprotease inhibitor 2	7077	1,84
CAV1	Caveolin 1, Caveolae protein	857	1,78
TNIP1	TNFAIP3 interacting protein 1	10318	0,61
DOCK7	Dedicator of cytokinesis	85440	0,6
CXCR4	chemokine (C-X-C) motif receptor 4	7852	0,58
IL4R	Interleukin-4 Receptor	3566	0,58
IRAK2	Interleukin-1 receptor-associated kinase 2	3656	0,57
DUSP6	dual specificity phosphatase 6	1848	0,56
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	3383	0,56
DUSP4	dual specificity phosphatase 4	1846	0,54
BIRC3	baculoviral IAP repeat containing 3	330	0,5
IL8	Interleukin-8	3576	0,42
FOS	v-fos FBJ murine osteosarcom viral oncogene homolog	2353	0,42

3.2.4 Einfluss von Grx3 in Prozessen der Eisenregulation und der Eisenhomöostase

Die Zelle muss einerseits über eine ausreichende Konzentration an Eisen verfügen, andererseits ist eine zu hohe Konzentration an Eisen toxisch für die Zelle, so dass das Eisenlevel exakt reguliert werden muss.

Um den Einfluss von Vertebraten-Grx3 auf die Eisenhomöostase, eisenbindende Proteine oder Proteine der Hämbiosynthese zu identifizieren, wurde die Microarrayanalyse auf Veränderungen in den Transkripten von Proteinen der Hämbiosynthese (siehe Tabelle 3.3), beispielsweise der HO-1 oder CYP24A1, CYP1B1 bzw. FADS3 als hämbindende Proteine hin analysiert. Ebenso wurde die Expressionsrate des Sauerstoffsensors EGLN3 und der eisenbindenden Oxidoreduk-

tase HPD reguliert. Weiter wurde die Transkription der Gene MafF, einem Transkriptionsfaktor zur Regulation von Ferritin H oder von NDUFS2, einem Protein der Kerneinheit des Komplexes I reguliert. Anstelle einer Q-RT-PCR-Analyse wurde im weiteren Verlauf eine Westernblotanalyse auf die wichtigsten regulatorischen Proteine der Eisenregulation durchgeführt (s. Abbildung 3.24 A und B).

Tabelle 3.3: Regulation der Transkription von Proteinen, die an der Eisenregulation oder der Eisenhomöostase beteiligt sind.

Abkürzung	Name	GenID	Änderung (log2)
HO-1	Heme oxygenase 1	3162	2,43
SNCA	Synuclein alpha	6622	2,15
MPPED2	Metallophosphoesterase domain containing 2	744	2,05
CYP24A1	Cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1	1591	1,98
CYP1B1	Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	1545	1,82
FADS3	Fatty acid desaturase 3	606150	1,79
NDUFS2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2	4720	0,58
EGLN3	egl nine homolog 3	112399	0,45
HPD	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	3242	3,53
PPFIBP1	PTPRF interacting protein, binding protein 1	8496	0,58
MafF	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)	23764	0,57

In der Bäckerhefe wird vermutet, dass Grx3 eine Funktion im Transport von Eisen durch das Zytosol besitzt bzw. eine Funktion als Eisensensor hat [172]. In diesem Kontext sollte eine hier durchgeführte Versuchsreihe klären, ob Grx3 in Vertebraten analoge Funktionen übernehmen kann. Hierzu wurden HeLa-Zellen dreimal in einem Abstand von drei Tagen mit Kontroll- oder siGrx3-(TS1)-siRNA transfiziert. Drei Tage nach der letzten Transfektion wurden die Zellen geerntet. Zur Bestimmung der Expression verschiedener, in die Eisenhomöostase invol-

vierter Proteine, wurde eine Westernblotanalyse nach Depletion von Grx3 durchgeführt. Diese Analyse zeigte eine Abnahme von Ferritin, IRP1 und Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase (GPAT), die Expression des TfR nahm zu und die Expression von IRP2 wies keine Veränderungen auf (siehe Abbildung 3.24 A, B). Diese Ergebnisse deuten auf eine Funktion von Grx3 in der Verteilung von Eisen in der Zelle hin. Besonders deutlich ist dies an der Reduktion von GPAT zu erkennen. GPAT ist ein Protein, das im Zytosol als inaktives Proenzym translatiert wird. Für die Reifung des Proteins werden zwei Prozesse benötigt. Erstens ist die Koordination eines [4Fe-4S]-Zentrums nötig und zweitens muss ein Propeptid aus 11 Aminosäureresten am N-Terminus abgespalten werden [173,174]. In der Literatur wurde gezeigt, dass sich die Stabilität von GPAT durch Einbau des Fe/S-Zentrums erhöhte. In der durchgeführten Westernblotanalyse zeigte sich nach siRNA-vermittelter Depletion von Grx3 eine Reduktion des GPAT-Levels. Für Ferritin und den TfR ist bekannt, dass sie über eine IRP-vermittelte Transkription reguliert werden. Ferritin-mRNS besitzt am 5'-Ende ein IRE im nichtkodierenden Bereich [175]. Bindet hier ein IRP an das IRE, wird die Produktion von mRNS reduziert und als Folge kann weniger Eisen in der Zelle gespeichert werden. Im Falle des TfRs handelt es sich um einen Oberflächenrezeptor, der zur Aufnahme von Ferritin-gebundenem Eisen verwendet wird. Im nichtkodierenden Bereich des 3'-Endes der TfR-mRNS befinden sich fünf IREs [176]. In diesem Fall führt eine IRE-IRP-Bindung zu einer Erhöhung der mRNS-Stabilität. Exprimiert die Zelle große Mengen an TfR führt dies zu einer erhöhten Eisenaufnahme.

Für die experimentelle Bestimmung, ob die veränderte Genexpression von beispielsweise Ferritin oder TfR aus Unterschieden in der IRP-Bindekapazität stammt, wurde ein REMSA durchgeführt. Für die Bindung von IRP1 an IREs gilt: In Abwesenheit eines Fe/S-Zentrums nimmt die RNS-Bindekapazität von IRP1 zu, während sie in Anwesenheit eines Fe/S-Zentrums in IRP1 gesenkt wird. Um in diesem Experiment zwischen IRP1 und IRP2 unterscheiden zu können, wurde das Zell-Lysat mit einem anti-IRP2-Antikörper inkubiert, so dass es zu einem Supershift von IRP2 kam. Nun konnte über eine Bindung an [α - ^{32}P]CTP-markiertes IRE von Ferritin die Menge an gebundenem IRP1 bestimmt werden (siehe Abbildung 3.24 C). Eine Analyse mittels Phosphoimager zeigte, dass in Abwesenheit von Grx3 die Bindeaktivität von IRP1 zunimmt. Eine maximale Bindekapazität lag nach Behandlung der Proben mit β -Mercaptoethanol vor. Der Koeffizient aus IRP1 in An- und Abwesenheit von β -Mercaptoethanol ergibt die IRE-Bindekapazität von IRP1. IRP2 trägt kein Fe/S-Zentrum, hat aber eine eisenabhängige IRE-Bindekapazität. Zur Bestimmung der IRP2 Bindeaktivität wurden die Zell-Lysate mit einem anti-IRP1-Antikörper versehen, so dass es hier zum Supershift von IRP1 kam und die Bindeaktivität von IRP2 untersucht werden konnte. Für IRP2 war keine Regulation der Bindekapazität in Abhängigkeit von Grx3 detektierbar (siehe Abbil-

dung 3.24 C). Die hier gezeigten Ergebnisse korrelieren mit den in Westernblots bestimmten Änderungen in der Expression von Ferritin und TfR.

Weiter wurde überprüft, ob durch eine Veränderung im Grx3-Level die Aktivität von Fe/S-Zentren koordinierenden Proteinen verändert wird. Hierzu wurden die transfizierten HeLa-Zellen drei Tage nach der letzten Transfektion in einem digitoninhaltigen Puffer lysiert und lösliche von membrangebundenen bzw. von membranumschlossenen Proteinen getrennt. Die Qualität dieser Fraktionierung wurde anhand der Laktatdehydrogenaseaktivität in der mit Mitochondrien angereicherten Fraktion (Pellet) und der Aktivität der zytosolischen Citratsynthase bestimmt. Eine Bestimmung der Enzymaktivitäten ergab für die Laktatdehydrogenase einen Wert unter 10% in der Mitochondrien angereicherten Pelletfraktion (siehe Abbildung 3.24 F) und für die zytosolische Citratsynthase einen Wert, der unter 3% in der zytosolischen Fraktion (siehe Abbildung 3.24 E) lag. Die Fraktionierungen wiesen bereits eine sehr gute Qualität auf. Alle im folgenden bestimmten Enzymaktivitäten wurden durch kolorimetrische Tests bestimmt.

Nachfolgend wurde die Aktivität der zytosolischen Aconitase (IRP1) und der Laktatdehydrogenase bestimmt. IRP1 ist ein zytosolisches Fe/S-Markerprotein, das zweierlei Funktionen hat. Erstens liegt es als Aconitase, einem Fe/S-Protein als mitochondriales Protein vor, und zweitens kann es als Protein ohne Fe/S-Zentrum (IRP1) im Zytosol vorliegen, an IREs binden und hierüber die Stabilität der mRNS verändern. Durch die Verwendung eines digitoninhaltigen Puffers konnte zwischen Aconitase und IRP1 unterschieden werden. Hierbei zeigte sich in Abwesenheit von Grx3 eine Reduktion der Aconitaseaktivität auf etwa 64% der Kontrollaktivität (Abbildung 3.24 D). Als Kontrolle diente die Messung der Citratsynthase, einem Enzym, das nach heutigem Kenntnisstand kein Fe/S-Zentrum koordiniert. In den hier durchgeführten Experimenten zeigte sich, dass die Aktivität der Citratsynthase und der Succinatdehydrogenase unabhängig vom Grx3-Level in der Zelle ist (Abbildung 3.24 E, G). Die Aktivität des Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette wurde in Abwesenheit von Grx3 um 40 % reduziert (Abbildung 3.24 H). Folglich deuteten die Messungen an, dass es bei einer Depletion von Grx3 zu Defekten in der mitochondrialen Fe/S-Proteinaktivität in humanen Zellen kommt (siehe Abbildung 3.24 D-H).

In einem weiteren Modellorganismus (*Danio rerio*) zeigte ein Vergleich von Kontrollinjektion und von der Injektion Grx3-spezifischer Morpholinos 48 h.p.f. eine deutliche Reduktion des Häm-Gehaltes nach o-Dianosid-Färbung (siehe Abbildung 3.23). Hierdurch wird bei Depletion von Grx3 die Aktivität des Komplex IV reduziert. Beim Komplex IV handelt es sich um ein Hämprotein bestehend aus zwei Häm a und zwei Kupferzentren.

Um festzustellen, ob durch eine Depletion von Grx3 neben der bereits erwähnten Veränderung in den Proteinleveln eisenabhängiger Proteine bzw. in den Änderungen von enzymatischen

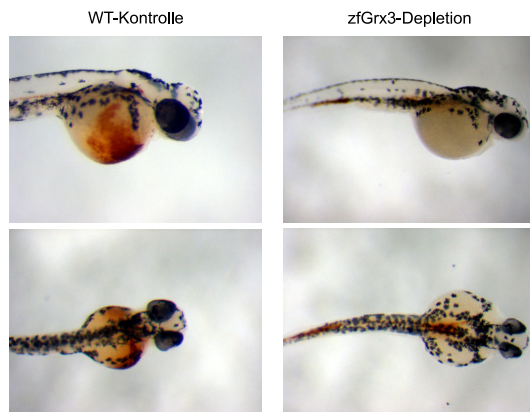


Abbildung 3.23: ***Einfluss der Grx3-Expression auf die Hämbiosynthese.***

D. rerio wurden entweder mit Grx3 oder Kontroll-Morpholinos injiziert. o-Dianosid-Färbung von *D. rerio* Embryonen 48 Stunden h.p.f. (oben: lateral; unten: dorsal). (*D. rerio*-Experimente unter freundlicher Bereitstellung von Lars Bräutigam, Karolinska Institutet, Stockholm, Schweden).

Aktivitäten auch die Aufnahme von Eisen bzw. die Lagerung von Eisen in der Zelle verändert wurde, wurden HeLa-Zellen für 4 Stunden bzw. 3 Tage mit Transferrin gekoppelten ^{55}Fe behandelt. Eine Analyse dieser Zellen mittels Szintillationszählung zeigten, dass es nach dreitägiger Inkubation mit ^{55}Fe unter Standard Kultivierungsbedingungen zu einem Anstieg in der Eisenaufnahme kam (siehe Abbildung 3.24 I).

Zusammengefasst deuten die hier gezeigten Ergebnisse einen Einfluss von Grx3 auf das intrazelluläre Eisen-Trafficking und die Detektion des Eisengehaltes, durch einen bisher noch unbekannten Mechanismus, an.

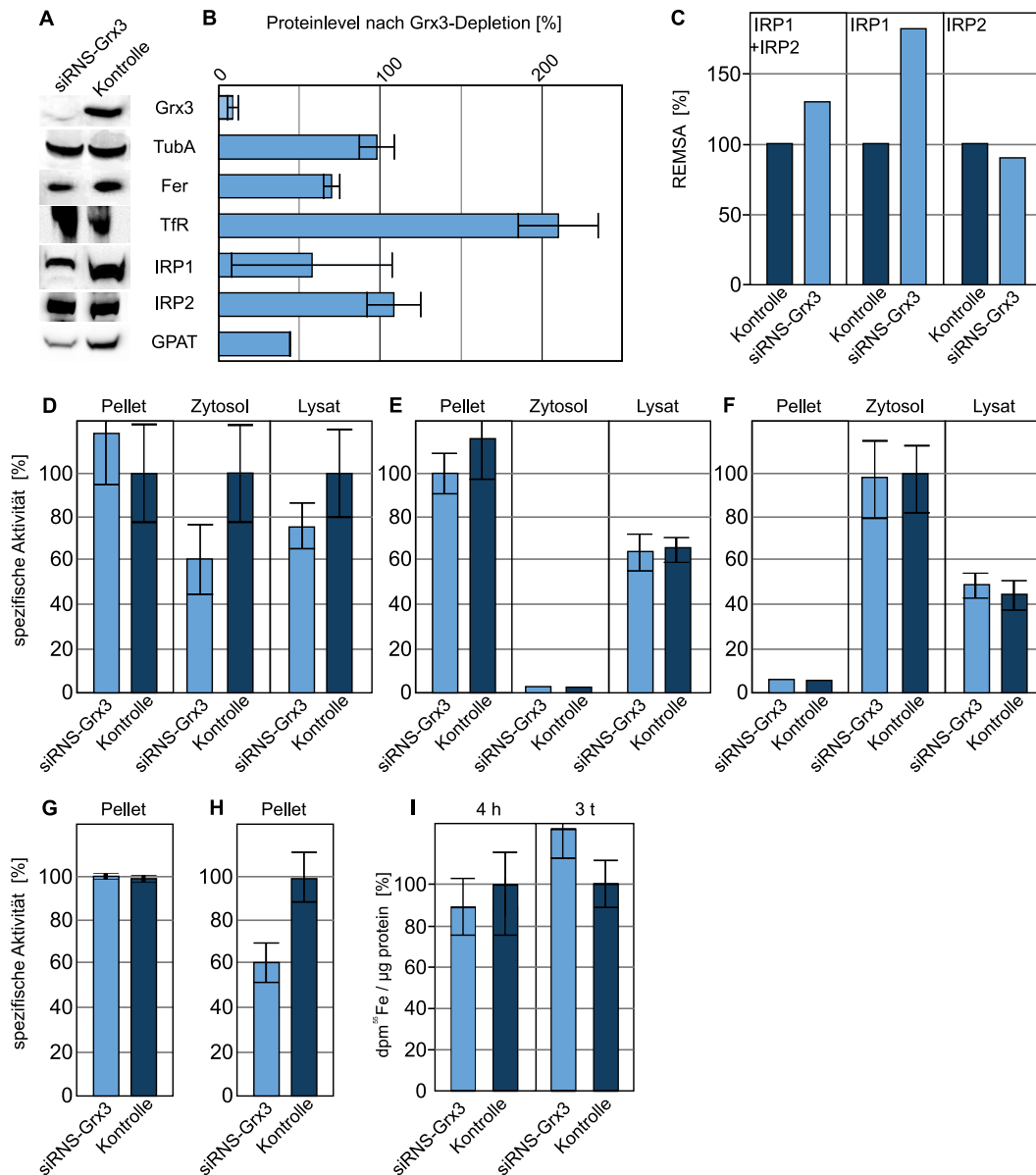


Abbildung 3.24: **Einfluss der Grx3-Expression auf die Eisenhomöostase.** HeLa-Zellen wurden dreimal in einem Abstand von drei Tagen mit Kontroll- bzw. Grx3-spezifischer-siRNA transfiziert (**A bis I**). (**A und B**): Links: Westernblot nach Transfektion von HeLa-Zellen, rechts: Quantifizierung ($n = 3$). (**C**): REMSA, links: IRP1 und IRP2 Bindeaktivität, mittig: IRP1 Bindeaktivität und rechts: IRP2 Bindeaktivität an IRE's. (**D bis H**) spezifische Enzymaktivitäten nach differentieller Genexpression ($n = 3$). (**D, G, H**) wurden in jeder Fraktion auf die Kontrollaktivität normiert. (**D**) spezifische Aconitaseaktivität, Pellet und Lysat wurden auf die Citratsynthaseaktivität, die zytosolische Fraktion wurde auf die Laktatdehydrogenaseaktivität normiert. Enzymaktivitäten der: (**E**) Citratsynthase, (**F**) Laktatdehydrogenase. Die (**G**) Succinatdehydrogenaseaktivität wurde auf auf die Citratsynthaseaktivität normiert und (**H**) zeigt die Komplex IV Aktivität.)

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Grx3 koordiniert einen Kofaktor

Im Vorfeld dieser Arbeit konnten einige Grx'e als Fe/S-Zentren koordinierende Proteine beschrieben werden, die sich als gelblich-braunes Protein reinigen ließen [91]. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass Grx3 ebenfalls als gelblich-braunes Protein gereinigt werden konnte, wobei die Färbung unter aeroben Bedingungen schnell verblasste. In weiteren Analysen zeigten sich Analogien zwischen dem Fe/S-Zentrum von Grx3 und zuvor charakterisierten Fe/S-Zentren, beispielsweise von humanem Grx2 [91], dithiol GrxC1 der Pappel [177] und dem monothiol Grx von *Synchocystis* [178]. Im Falle von Grx2 zeigten biochemische Analysen [22] und kristallographische Untersuchungen [179] einen Holokomplex, der zwischen zwei apo-Grx2 ein Fe/S-Zentrum über die N-terminalen Cysteinreste und über zwei nicht-kovalent gebundene GSH-Moleküle koordinierte. Hierzu wurde das aktive Zentrum (C-S-Y-C) benötigt. Zur Charakterisierung des Fe/S-Zentrums in Grx3 wurden anaerobe Reinigungen, Absorptions- und Mößbauer-Spektroskopie sowie Rekonstitutionsexperimente durchgeführt. Die in dieser Arbeit angefertigten Rekonstitutionen wurden mit einem System basierend auf IscS durchgeführt, da dieses den *in vivo* Bedingungen ähnlicher ist als eine chemische Rekonstitution. In den Rekonstitutionen wurde Cystein als Schwefelquelle, Eisen(II) als Eisenquelle und DTT als Reduktionsmittel zugegeben. Weiter wurden Pyridoxalphosphat und GSH dem System beigelegt. Als Eisenüberträger wurde schließlich IscS zugegeben. Alles in allem bestätigten die Experimente die Koordination von GSH-abhängigen [2Fe-2S]-Zentren.

Im Gegensatz zu monothiol Grx'en aus Bakterien und Hefe enthält Vertebraten Grx3 zwei monothiol Grx Domänen [71]. Versuche zur Quantifizierung der Fe/S-Zentren zeigten, dass zwei Eisen- und zwei Schwefelatome pro Monomer gebunden sind. Aus diesen Daten und der Tatsache, dass Grx3 dimerisiert (siehe Abbildung 3.10) lässt sich schlussfolgern, dass die beiden Grx3-Moleküle durch Koordination der Fe/S-Zentren dimerisieren. Im Dimer können

die beiden Grx3-Moleküle eine *head-to-head* bzw. eine *head-to-tail* Konfiguration aufweisen. Zusammen mit einer Analyse von Deletionsmutanten (Trx, GrxA, GrxB, Trx-GrxA und GrxA-GrxB) und der geometrischen Ähnlichkeit zum Holo-Grx2-Komplex und zum Holo-GrxC1-Komplex in Pflanzen [177, 179] scheint eine *head-to-head*-Konfiguration des Grx3-Dimerkomplexes wahrscheinlicher zu sein. Ein hypothetisches Modell macht es wahrscheinlich, dass die aktiven Zentren der beiden Grx-Domänen sich achsensymmetrisch gegenüberstehen, so dass sie in der Summe zwei Fe/S-Zentren zusammen mit zwei nicht-kovalent gebundenen Molekülen GSH koordinieren. Die Trx-Domäne ist über eine Linker-Domäne, die über hydrophobe und hydrophile Aminosäuren verfügt, mit den Grx-Domänen verbunden. Hierdurch kann die Trx-Domäne in der vorgegebenen Struktur eine Vielzahl von Positionen zu den Grx-Domänen einnehmen, wodurch Interaktionen mit dem umgebenden Milieu oder Protein-Protein-Interaktionen ermöglicht werden könnten (siehe Abbildung 4.1 und 3.12). Eine spezifische Interaktion der Trx-Domäne mit PKC-Isoformen [94] oder eine Interaktion

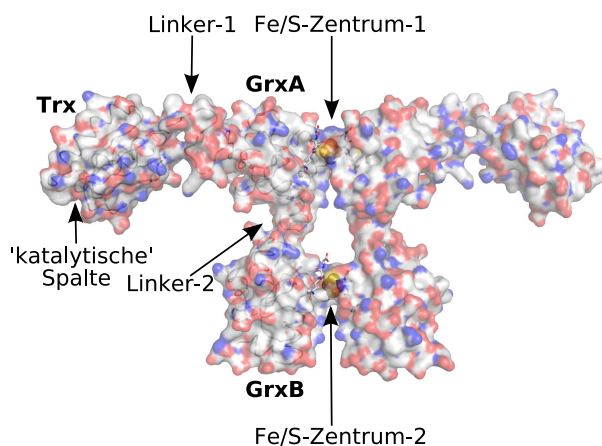


Abbildung 4.1: **Modell von dimerisiertem Grx3.** Hypothetisches Modell des Grx3-Holokomplexes. Die Struktur der Grx3-Domänen wurde basierend auf dem pdb Eintrag 2wik (zweite Grx-Domäne von Maus-Grx3) moduliert, die Trx-Domäne repräsentiert den Eintrag 2diy (Trx-Domäne von humanem Grx3). Die Linker-1-Region stammt aus dem pdb-Eintrag 3dxb (PUF60 an Trx fusioniert). Der Komplex aus Grx3 mit den Fe/S-Zentren wurde basierend auf dem 2HT9 (humanes Grx2) modelliert. Im Modell sind Linkerregionen und die Lage der Trx-Domänen spekulativ.

der Grx-Domäne mit MLP [107] konnte bereits gezeigt werden. Bisher waren alle gezeigten Aktivitäten von Grx3 abhängig von der Präsenz einer Grx-Domäne, obwohl Protein-Protein-Interaktionen über die Trx-Domäne vermittelt wurden [94]. Möglicherweise ist die Anwesenheit des Fe/S-Zentrums als Aktivitätsregulator von Grx3 wichtig. Die Bildung des Holokomplexes über Fe/S-Zentren in den aktiven Zentren könnte die Protein-Protein-Interaktionen der Grx-Domänen regulieren. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass das Dimer selbst Interaktionen mit verschiedenen Proteinen und Proteinkomplexen vermittelt. Es bleibt nach wie vor zu klären, ob beispielsweise die Holo- oder Apo-Form von Grx3 als Inhibitor von

PKC-Isoformen aktiv ist [94].

Durch die Multidomänenstruktur von Grx3 ist ein idealer Ausgangspunkt für viele unterschiedliche Protein-Protein-Interaktionen bereitgestellt. So ermöglicht die Trx-Faltung eine Vielzahl an spezifischen Interaktionen mit Substraten mit einer großen Variation an Liganden in der Bindetasche inklusive des katalytischen Zentrums (normalerweise C-X-X-C) und einem cis-Prolin-loop [8]. Die Trx-Domäne von humanem Grx3 verfügt allerdings nicht über das für eine Redoxaktivität essentielle dithiol Motif. Jedoch konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden, dass die Trx-Faltung unabhängig von jeglicher Redoxaktivität eine Plattform für zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen bereitstellt. Beispiele hierfür sind der Prozessivitätsfaktor der Bakteriophagen T7 DNS-Polymerase [180] und Aktivatoren von Enzymen, die in den Chloroplasten lokalisiert sind [181]. Eine mögliche Funktion von Grx3 ist die Regulation von Signaltransduktionskaskaden als Antwort auf ROS [104]. Diese Regulation könnte durch Konfigurationsänderungen von Grx3 als Antwort auf ROS reguliert werden. In der Vergangenheit wurde Grx2 bereits als Redoxsensor postuliert [91]. Im Gegensatz zu Grx3 weist das Fe/S-Zentrum des dithiol Grx, Grx2, eine deutlich erhöhte Stabilität auf [91]. Nach Behandlung von Grx3 mit Ferricyanid oder GSNO war eine beschleunigte Dissoziation des Fe/S-Zentrums detektierbar (siehe Abschnitt 3.1.5). Dies deutet darauf hin, dass die Quartärstruktur von Grx3 nach spezifischer Redoxmodulation durch Ein-Elektron-Oxidation oder RNS selber moduliert werden kann.

Obwohl in den vergangenen Jahren eine stetig steigende Anzahl von Fe/S-Kofaktoren in Grx'en identifiziert wurde [177,178,182,183], konnte für Grx3 eine Fe/S-Koordination *in vivo* gezeigt werden. Bisher war dies lediglich für das dithiol Grx2 gelungen [91,184].

4.2 Lokalisation von Grx3

Immunohistochemische Analysen sind eine anerkannte Methode zur Bestimmung von Proteinexpression und Proteinlokalisierung in histologischen Gewebeschnitten. Vor der Diskussion der immunohistochemischen Ergebnisse dieser Arbeit soll auf einige Probleme in der Auswertung von immunohistochemischen Färbungen hingewiesen werden. Ein qualitativ hochwertiger Nachweis von Proteinen in Gewebsschnitten benötigt Antikörper mit einer hohen Sensitivität und Spezifität. Um dies zu gewährleisten, wurde in den durchgeführten Experimenten ein affinitätsgereinigter Antikörper verwendet, der zuvor in Westernblotanalysen und in Blockexperimenten getestet wurde. In beiden Experimenten wiesen sie eine hohe Spezifität für die entsprechenden Antigene auf. Um zu zeigen, dass keine unspezifischen Färbungen durch den Sekundärantikörper hervorgerufen werden, wurde für jedes Organ eine Kontrolle

ohne Primärantikörper durchgeführt. Mit Hilfe von Kontrollexperimenten können falschpositive Färbungen ausgeschlossen werden. Weitere Probleme und Artefakte können durch Bearbeitung, Fixierung und Einbetten der Gewebe auftreten. Weiter ist die Präsentation eines Antigens im Gewebe von entscheidender Bedeutung. Ergebnisse aus den Färbungen liefern deshalb nur Anhaltspunkte, können aber nicht als Beweis für die Expression von Grx3 in den entsprechenden Geweben gesehen werden. Konnte mittels Immunohistochemie kein Grx3 detektiert werden, lässt sich hieraus nicht die Abwesenheit des Proteins schlussfolgern, da evtl. das Epitop des Antigens maskiert ist. Generell ist in immunohistologischen Schnitten keine Quantifizierung der Proteine möglich. Auch subzelluläre Lokalisationen sind nur ein Hinweis und kein Beweis. Für eine genauere Analyse müssen weiterführende Experimente durchgeführt werden, beispielsweise könnte Grx3 mit einer Nukleotidexitzsequenz versehen werden.

Ein gezieltes Ausschalten des Grx3-Gens resultierte in embryonaler Letalität zwischen E12,5 und E14,5 [109]. Dies ging mit einer Verminderung der Körpergröße und mit Blutungen im Kopfbereich einher [109]. Eine histologische Untersuchung der Embryonen lies jedoch auf keinerlei Defekte in der Organogenese schließen [109]. Neben der Involvierung in die Embryonalentwicklung kann Grx3 auch Funktionen bei der Aktivierung von T-Zellen [94] und der Hypertrophie des Herzens übernehmen [106]. Interessanterweise konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass Grx3 als einziges Protein der Trx-Superfamilie in den Germinativen Zentren der Lymphknoten lokalisiert ist [159]. Dies ist eine wichtige Region für die Reifung und Aktivierung von B-Lymphozyten, einem Prozess der mit einer Interaktion von naiven B-Zellen mit CXCR5+ follikularen T-Helferzellen einhergeht [185]. In der Milz konnte eine starke Immunfärbung von Grx3 um die Zentralarteriole detektiert werden. Diese Region kann als T-Zellzone identifiziert werden, in der T-Zellen mit dendritischen Zellen und durchwandernden B-Zellen interagieren können [186]. In der Literatur konnte gezeigt werden, dass eine transiente Überexpression von Grx3 zu einer Aktivierung der c-Jun-N-terminalen Kinase und der Transkriptionsfaktoren AP-1 und $\text{Nf-}\kappa\text{B}$ in stimulierten T-Zellen führt. Dies könnte ein Hinweis für eine Interaktion zwischen Grx3 und PKC-ähnlichen Kinasen sein. [94]. Durch die in dieser Arbeit durchgeführten immunohistochemischen Färbungen konnte gezeigt werden, dass Grx3 in der Milz oder den Germinativen Zentren lokalisiert ist (siehe Abbildung 3.7 und 3.8).

In der Literatur wurde das humane Grx3 ausschließlich als zytosolisches Protein beschrieben [94]. In den hier durchgeführten immunologischen und immunozytochemischen Färbungen konnte Grx3 erstmals als zytosolisches und nukleäres Protein beschrieben werden. In der Mehrzahl der untersuchten Gewebe zeigte Grx3 eine Verteilung, die auf eine zytosolische und nukleäre Lokalisation hindeutete. Eine nukleäre Lokalisation ist in der Substantia nigra, in Pyramidalzellen des cerebralen Kortex, in Purkinjezellen des Cerebellums, im Plexus coro-

ideus, in den Motoneuronen des Rückenmarks, in Epithelzellen von Zunge und Ösophagus, im Germinativen Zentrum der Lymphknoten, in runden Spermatiden, im Eifollikel und sekretorischen Zellen im proximalen Tubulus der Niere, in Kardiomyozyten und in Sebaceous-Drüsenzellen detektierbar. Immunozytochemische Experimente zeigten ebenfalls eine Kernlokalisation, während der Pearson-Koeffizient (0,44) eine Kolo-kalisation nur vermuten lässt, liefert der Manders-Koeffizient ($M1 = 1$, $M2 = 0,893$) Informationen für eine partielle Kolo-kalisation von Grx3 mit einzelnen Bereichen im Zellkern. In Kardiomyozyten deutete sich eine nukleäre Färbung an, die auf eine Funktion in der Herzphysiologie hindeuten könnte. Bisher konnte in der Literatur eine nukleäre Lokalisation für die Hefe-Homologe Grx3/4 gezeigt werden [187,188]. Im Falle der Hefe wird Grx3/4 zwischen Kern und Zytosol transloziert, wobei es im Kern zu einer Aktivierung von Aft1/2 kommt, wodurch die Transkription von Genen des Eisenregulons gesteigert wird, wie beispielsweise zelluläre Oberflächeneisentransporter oder Proteine zur Regulation des intrazellulären Eisengehaltes [189,190]. Ebenfalls kann durch das Aft1 oder Aft2 das intrazelluläre Eisenniveau bestimmt werden. Für diesen Prozess wird neben Aft1/2 auch Fra1-Fra2 sowie das zytosolisch-nukleäre Grx3/4 benötigt. Unter Mithilfe von Aft oder Fra kann Grx3/4 bei einem ausreichend hohen Eisenniveau aus dem Kern transloziert werden [137,138,191].

4.3 Proteine der Thioredoxinfamilie in Krankheitsprozessen

4.3.1 Grx3 nimmt Einfluss auf verschiedene Elemente des Zytoskeletts und auf die Hypertrophie des Herzens

Mit einem der höchsten Sauerstoffdurchsätze entsteht im Herzen eine große Menge an ROS. Folglich sind Proteine der Trx-Familie an vielen Herzerkrankungen wie beispielsweise Herzhypertrophie beteiligt [22,192–198]. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine Trx1 Überexpression vor einer durch α -adrenerge Rezeptoren stimulierten Hypertrophie schützt [199], wohingegen eine Überexpression von Txnip oder einer dominant negativen Trx1 Mutante die Entstehung von Hypertrophien förderte [200,201].

Auch für Grx3 konnte in der Vergangenheit eine Schutzfunktion gegenüber Hypertrophie beschrieben werden, die in dieser Arbeit bereits in Abschnitt 1.1.3.1 behandelt wurde. Jedoch ist bis heute unklar, wie dieser Schutzmechanismus auf molekularer Ebene funktioniert. Bisher konnten Signalwege identifiziert werden, die Einfluss auf die Hypertrophie des Herzens nehmen und in die Proteine der Trx-Familie involviert sind. Hierbei handelt es sich um den: Calcineurin/NFAT-, Ras/Raf/ERK- oder ASK-1/JNK/p38-Weg [22]. Insbesondere für Grx3 konnte in der Literatur gezeigt werden, dass durch eine Bindung von Grx3 an MLP der Z-disc PKC abhängige Stoffwechselwege oder das NFAT-Signaling beeinflusst werden. Im Rahmen

dieser Arbeit konnte eine Expression von Grx3 im humanen Herzen mittels RT-PCR (siehe Abbildung 3.6) oder im murinen Herzen mittels Immunozytochemie (siehe Abbildung 3.7 (24 und 25)) nachgewiesen werden, wodurch die Präsenz von Grx3 im Herz gezeigt wurde.

In der Literatur konnte ebenfalls eine Hypertrophie des Herzens mit dem Eisenstoffwechsel in Zusammenhang gebracht werden. Ein Beispiel hierfür ist Friedreich-Ataxie, eine autosomal rezessive neurodegenerative bzw. kardiodegenerative Krankheit, die durch Mutationen im humanen Frataxin-Gen entsteht [202, 203]. Frataxin ist an der Fe/S-Biogenese beteiligt und somit auch an der Hämsynthese. Weiter kann Frataxin eine Funktion als Eisenchaperon übernehmen und Fe^{2+} in eine biologisch verwertbare Form umwandeln. Folglich führen Defekte im Frataxin-Gen zu Defekten in der Fe/S-Biogenese bzw. der Hämbiosynthese. Im Rahmen dieser Arbeit konnte in HeLa-Zellen gezeigt werden, dass Grx3 für die Verteilung von Fe/S-Zentren auf Zielproteine benötigt wird (siehe Abbildung 3.24). Genauso wie eine Depletion von Grx3 zu einer Reduktion der Häm-Biosynthese führte. Weiter konnte in dieser Dissertation gezeigt werden, dass die IRP1-Bindekapazität vom Grx3-Proteingehalt der Zelle abhängig ist. Es steht zu vermuten, dass Grx3 in die, in diesem Jahr publizierte Regulation von IRP1 durch extramitochondriales Frataxin [204] involviert sein könnte, bzw. durch eine veränderte Grx3-Expression vergleichbare Prozesse aktiviert werden. Schließlich konnte eine zytoskeletale Umorganisation beobachtet werden. Hier konnte gezeigt werden, dass es sich um Effekte handelte, die auch nach Depletion von Grx3 in HeLa-Zellen detektierbar waren (siehe Abbildung 3.24). Ferner konnte hier eine Beschleunigung der Zellmigration durch Depletion von Grx3 gezeigt werden. Wurde im Experiment jedoch alle 24 Stunden das Medium gewechselt, führte dies zu einer Aufhebung des Effektes und die Zellen migrierten mit einer vergleichbaren Geschwindigkeit, unabhängig von ihrem Grx3-Proteinlevel (siehe Abbildung 3.20). Dies lässt vermuten, dass ein unbekannter Faktor ins Medium sekretiert wird, der die Migrationsgeschwindigkeit beeinflusst (siehe Absatz 4.3.2). Ebenso waren Veränderungen in der Organisation des Zytoskelettes in dieser Arbeit beobachtbar gewesen (siehe Absatz 3.2.2). Werden die Daten aus der Literatur mit den Ergebnissen der hier durchgeführten Microarrayanalyse zusammengefasst (siehe Abbildung 4.2), lässt sich spekulieren, dass die von Jeong und Koarbeitern beschriebene Funktion von Grx3 zum Schutz vor einer Hypertrophie aus einer Veränderung in der Eisenregulation in Abhängigkeit von der Grx3-Expression stammen könnte [106, 108].

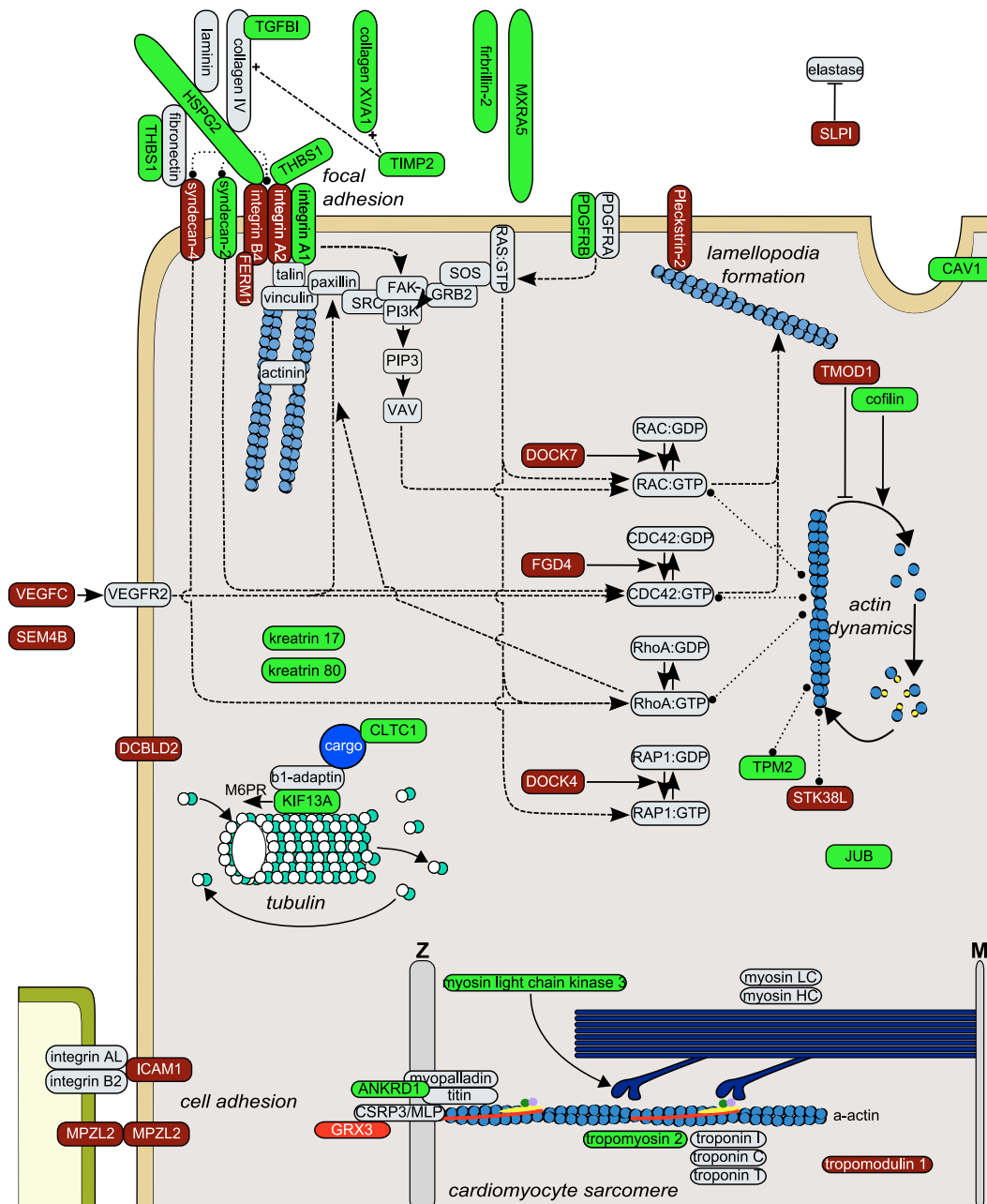


Abbildung 4.2: **Modell: Zytoskelett und Hypertrophie.** Hypothetisches Modell zur Regulation von zytoskeletalen Prozessen und der Hypertrophie des Herzens. Proteine mit einer erhöhten Expression (grün), Proteine mit einer reduzierten Expression (rot) nach Depletion von Grx3.

4.3.2 Grx3 ist an inflammatorischen Reaktionen beteiligt

Die Proteine der Trx-Familie sind ein Teil der Immunantwort. Sie können Funktionen als Chemokine und Zytokine übernehmen. So werden sie beispielsweise in Monozyten oder in Lymphozyten analog zu Interleukinen sekretiert [50]. Behandlungen von Monozyten mit Trx führten zu einem markanten Anstieg in der Zytokinexpression (z.B. $\text{TNF-}\alpha$), wohingegen in Fibrosarkomazellen die Expression von IL-6 deutlich erhöht wurde. Der Mechanismus für die Trx-Sekretion ist noch nicht verstanden, dennoch scheint es eine Verbindung zwischen oxidativem Stress und Entzündungsreaktionen zu geben [5].

In Virusinfektionen nehmen Trx'e und Grx'e eine essentielle Rolle im Lebenszyklus vieler Viren und Phagen ein [1, 205]. In den vergangenen Jahren konnte beispielsweise eine IL-2-abhängige Induktion des human-T-Zell-Lymphoma Virus-Typ 1 (HTLV-1) durch Trx gezeigt werden [206]. Wohingegen durch Txnip ein IL-2-unabhängiges Wachstum und ein Einfluss in der Progression in der Leukämogenese gezeigt werden konnte [207, 208]. Grx1 wurde in und auf der Oberfläche von HI-Viren identifiziert, beeinflusst die Aktivität von Proteasen *in vitro* und reguliert vermutlich die Proteaseaktivität in infizierten Zellen [209].

Eine Beteiligung von Grx3 in inflammatorischen Prozessen deutete sich bereits in der Lokalisationsanalyse von Grx3 in verschiedenen Mausorganen an (siehe Abbildung 3.7). So ist Grx3 in allen wichtigen Barrieren des Immunsystems exprimiert. Grx3 wird beispielsweise in der Haut, in Bereichen der T-Zellmigration in der Milz oder im Verdauungssystem exprimiert. Ebenfalls konnte durch die Ergebnisse der Microarrayanalyse gezeigt werden, dass Grx3 Einfluss auf inflammatorische Prozesse nehmen kann. So führte eine Depletion von Grx3 zu Veränderungen in Genen, die für die Zytoskelettorganisation verantwortlich sind, wie in Abbildung 3.19 gezeigt. Desweiteren konnte eine differentielle Genexpression für (DUSP4), DUSP6 und ICAM1 in der Microarrayanalyse nachgewiesen werden. Diese Veränderungen führen zu Unterschieden in der Zytokinfreisetzung, der Apoptose, der Migration und der Differentiation (siehe Abbildung 4.3). In der Literatur konnte beispielsweise gezeigt werden, dass ICAM1 die Migration in den humanen Brustkrebszellen MDA-MB-468 begünstigt [210]. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Migrationsanalysen (siehe Abbildung 3.20). In der Zelle ist ICAM1 ein Protein, das für die Anheftung von Leukozyten ans Endothel eine wichtige Rolle spielt. Bei der Entstehung von Entzündungsreaktionen interagieren Leukozyten zunächst mit dem Endothel, um es später durchwandern zu können [211]. Dies ist ein PKC abhängiger Prozess. In entzündlichen Prozessen kommt es zu einer Steigerung der ICAM1 Expression, die wiederum zu einer Aktivierung von Leukozyten führt, wodurch es zu einer Zirkulation von Liganden durch das Endothel kommt. Werden Zellen Häm ausgesetzt, kommt es ebenfalls zu einer gesteigerten Expression

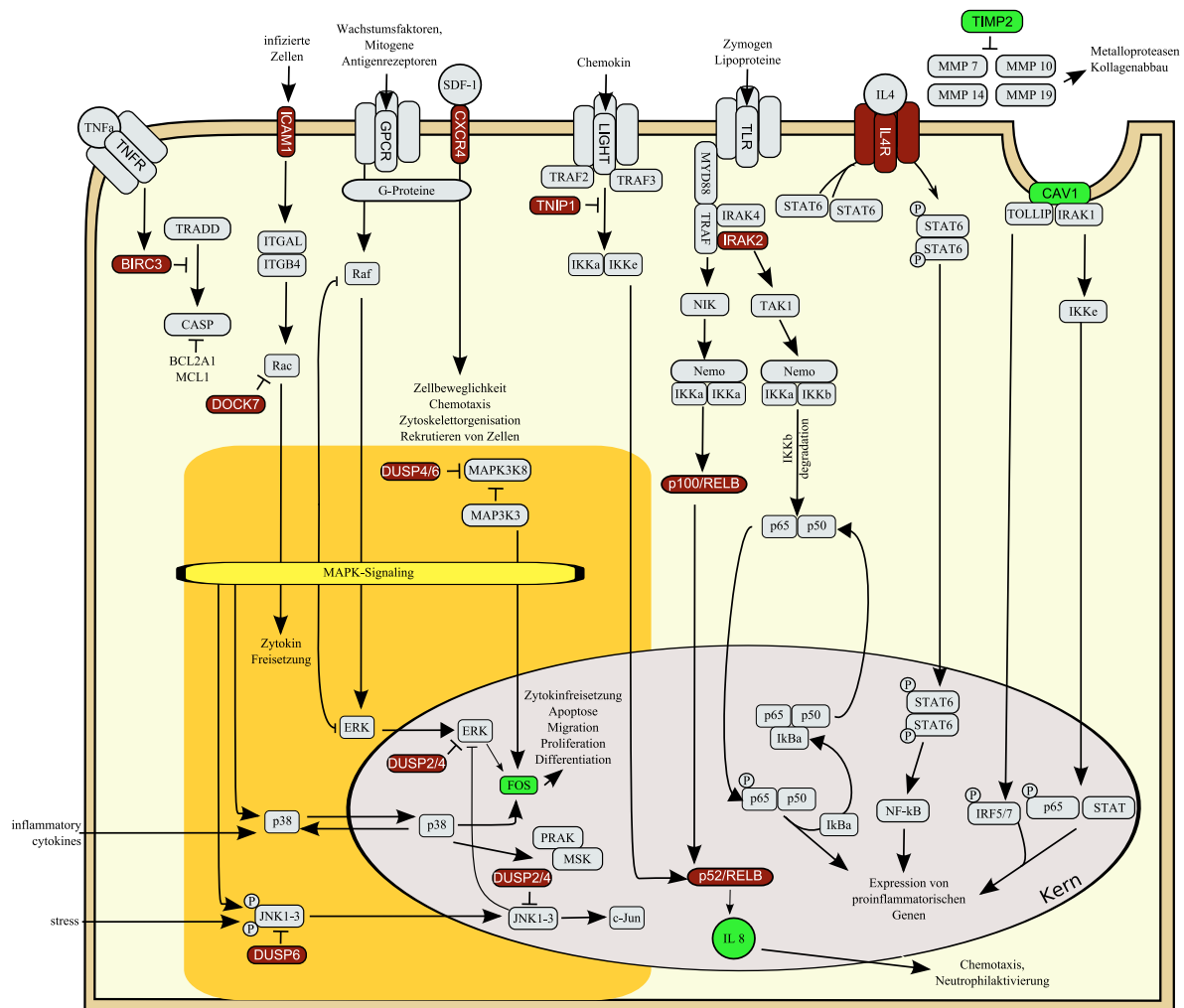


Abbildung 4.3: **Modell: Entzündungsmodell.** Hypothetisches Modell zur Regulation von Genen der inflammatorischen Antwort. Proteine mit einer erhöhten Expression (grün), Proteine mit einer reduzierten Expression (rot) nach Depletion von Grx3.

von ICAM1 oder VCAM-1 und E-Selektin, auf der Oberfläche von Endothelen. So können diese spezifisch mit Liganden passierender Leukozyten interagieren, wodurch beispielsweise die Rekrutierung oder die Anheftung von hematopoetischen Zellen gefördert wird [212–215]. Da in der durchgeführten Microarrayanalyse gezeigt werden konnte, dass bei einer Depletion von Grx3 unter anderem das ICAM1-Niveau reduziert wurde, kann Grx3 in Zusammenhang mit der Aktivierung von Leukozyten gesehen werden. Dies steht in Einklang mit der bereits publizierten Involvement von Grx3 in die Aktivierung von T-Zellen [94].

Ebenfalls konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass die HO-1, ein potenter *Inducer*

HO-1 reguliert sind indirekt beeinflussen. So führt beispielsweise eine Blockade der HO-1 zu einem Anstieg in Entzündungsreaktionen [219]. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die HO-1 in entzündlichen Prozessen hochreguliert wird. Bei dieser Induktion kommt es ebenfalls zu einem Anstieg in der Häm-Konzentration in der Milz oder in der Leber [220]. Folglich kann Häm eine proinflammatorische Funktion zugesprochen werden. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass Häm inflammatorische Gene aktiviert, während die HO-1 proinflammatorische Prozesse eher mildert. Der Schutz der Zelle durch die HO-1 ist in Abbildung 4.4 gezeigt. Aus den bisherigen Daten lässt sich eine überwiegend anti-inflammatorische Funktion von Grx3 schlussfolgern (siehe Abbildung 4.3). Allerdings lässt sich die Möglichkeit einer proinflammatorischen Funktion zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig ausschließen. Für eine endgültige Bestimmung der Funktion von Grx3 in inflammatorischen Prozessen bedarf es folglich noch weiterer Experimente. Denkbar wären Versuche in denen beispielsweise das Verhalten von isolierten T-Zellen in Bezug auf die Expression von Grx3 beispielsweise auf das Migrationsverhalten oder auf die Aktivität von Proteinen mit bekannter Funktion hin.

4.3.3 Grx3 ist an der Verteilung von Fe/S-Zentren im Zytosol beteiligt

In der Vergangenheit war es unklar, wie Eisen aus dem zytosolischen „freien“ Eisenpool der Zelle zu den eisenbindenden Proteinen oder in eisenabhängige Stoffwechselwege gelangt. In der hier durchgeführten Studie konnte für zytosolisch und nukleär exprimiertes humanes Grx3 gezeigt werden, dass es eine entscheidende Funktion im Transport von Eisen durch die Zelle einnimmt. Da für *S. cerevisiae* gezeigt werden konnte, dass diese Funktion durch das GSH-abhängige Fe/S-Zentrum vermittelt wird, liegt es nahe, dass diese Funktion in humanen Zellen ebenfalls über die beiden Fe/S-Zentren vermittelt werden könnte.

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zeigte sich, dass nach einer Transfektion mit Grx3(TS1)-spezifischer siRNA eine Situation analog zu einer Situation, wie sie unter Eisenmangel herrscht, vorliegt. So kommt es beispielsweise zu einer Destabilisierung eisenabhängiger Proteine, wie beispielsweise Fe/S-Proteine, Transkriptionsfaktoren, Di-Eisenproteine oder einer Reduktion im Häm-Gehalt. Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich keine direkte Involvierung von Grx3 in die Verteilung von Fe/S-Zentren vermuten. Eine Übergabe von Eisen an Komponenten der ISC-Maschinerie oder zytosolische Chaperone (z.B. PCBP1), die an der Synthese von extramitochondriale Fe-Proteinen beteiligt sind, ist wahrscheinlicher. Weiter zeigte sich, dass die primäre Funktion von vertebreten Grx3 im Zytosol liegt. In Aktivitätsassays änderten mitochondriale Proteine wie die Aconitase oder die Succinat-Dehydrogenase ihre Aktivität nicht. Daher scheint Grx3 mitochondriale Fe/S-Proteine bzw. mitochondriale Prozesse nicht zu beeinflussen. Dennoch kam es zu einer Ab-

nahme der Proteinlevel von GPAT oder IRP1, zwei zytosolischen Fe/S-Proteinen. Dies ist ein Indikator für einen Defekt in der Koordination von Fe/S-Zentren in GPAT. Hieraus lässt sich eine eher direkte Funktion von Grx3 auf extramitochondrielle Fe/S-Proteine vermuten und unspezifische Defekte in der Fe/S-Zentren-Biosynthese ausschließen. Folglich muss Grx3 an der Koordination von Fe/S-Zentren in GPAT beteiligt sein. Weiter zeigt das zytosolische

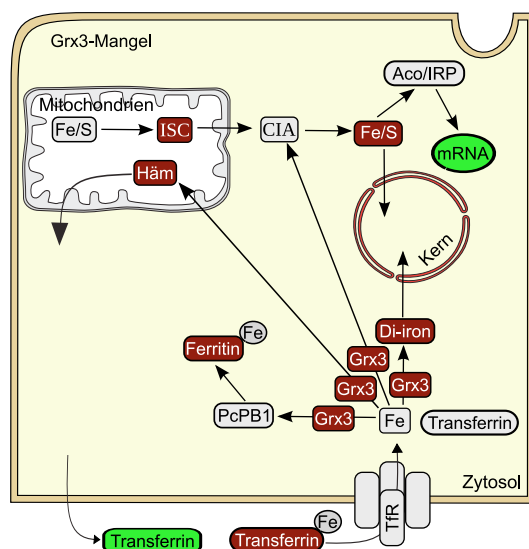


Abbildung 4.5: **Modell: Regulation eisenabhängiger Proteine in Abwesenheit von Grx3.** Hypothetisches Modell zur Regulation eisenabhängiger Proteine nach Depletion von Grx3. Proteine mit einer erhöhten Expression (grün), Proteine mit einer reduzierten Expression (rot).

IRP1 ein vermindertes Proteinlevel und eine Reduktion in der Aktivität, während die Bindekapazität von IRP1 an IREs in Abwesenheit von Grx3 zunimmt. Diese Effekte könnten alle darin begründet sein, dass apo-IRP1 in Abwesenheit eines Fe/S-Zentrums instabiler ist. Durch die Veränderungen in der IRE-Bindekapazität kommt es zu einem Eingriff in die Eisenhomöostase, da IRP1 an IREs von Ferritin und TfR bindet. Eine Bindung der IREs am 3'-Ende der mRNS verhindert die Translation der mRNS. Folglich kommt es zu einer Reduktion des Ferritinlevels. Eine Bindung von IRP1 an die IREs in der mRNS des TfR stabilisiert die mRNS und somit wird mehr Eisen transportiert. Durch die erwähnten Änderungen von Ferritin und dem TfR wird die generelle Funktion der Fe/S-Zentren Biosynthese im Eisenmetabolismus verdeutlicht. Ebenfalls ist aus diesen Ergebnissen ersichtlich, dass eine Reduktion des Grx3-Proteinlevels eine Situation, wie sie unter Eisenmangel vorliegt, simuliert (siehe Abbildung 4.5).

Da bei den durchgeführten Transfektionen mit nur einer Grx3-spezifischen siRNA gearbeitet wurde, könnte argumentiert werden, dass es sich bei den gezeigten Ergebnissen um Artefakte handelt. Dieses Argument kann jedoch bei einer genaueren Betrachtung der durchgeführten Microarray-Analyse entkräftet werden, da hier keine unspezifischen Interferon-Antworten erkennbar waren. Ein weiterer Hinweis, dass es sich in den gezeigten Ergebnissen nicht um Artefakte handelt, stammt aus den Experimenten, die in *D. rerio* durchgeführt wurden. Die

hier deutlich erkennbaren Defekte in der Hämoglobinsynthese und damit in der Hämsynthese, entstanden nach einer Reduktion des Grx3-Levels nach Injektion von Grx3-spezifischen Morpholinos. Außerdem konnte in *S.cerevisiae* gezeigt werden, dass Grx3/4 an einem spezifischen intrazellulären Eisentransport vom zytosolischen „freien“ Eisenpool zu den eisenbindenden Proteinen oder eisenabhängigen Stoffwechselwegen beteiligt ist [172]. Da die hier erzielten Ergebnisse in unabhängigen Experimenten in Organismen verschiedener Spezies bestätigt werden konnten, liegt es nahe, dass es sich bei den hier gezeigten Ergebnissen nicht um Artefakte der Transfektion von siRNA handeln kann.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen schlussfolgern, dass eine Reduktion des Grx3-Proteinlevels ging in der Zelle in fast allen eisenabhängigen Prozessen, inklusive der Hämbiosynthese und der zytosolischen Fe/S-Biosynthese, zu Defekten führt. Hingegen scheint die Fe/S-Biosynthese in den Mitochondrien nahezu unabhängig vom Grx3-Level in der Zelle zu sein. Eine Reduktion des Grx3-Proteinlevels mit einer Reduktion in der Aktivitätsabnahme des Komplexes IV einherging. Versuche mit *D. rerio* zeigten, dass eine Reduktion Grx3-Proteinlevel in einer deutlichen Reduktion des Hämgehaltes resultierten (siehe Abbildung 3.24). Hieraus lässt sich *in vivo* eine physiologische Funktion von Grx3 als Eisensensor und im Eisen-Trafficking herleiten. Vermutlich werden für diese Funktionen die Fe/S-Zentren benötigt.

4.3.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte die Koordination von 2 [2Fe-2S]-Zentren *in vitro* und *in vivo* für humanes Grx3 gezeigt werden. Durch den Einsatz von optischen Verfahren, z. B. der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, könnte eine Möglichkeit bestehen, Fe/S-Zentren bzw. die Dimerisierung mit einem besseren Signal- zu Hintergrundverhältnis zu detektieren, so dass die Fe/S-Zentren *in vivo* quantifiziert werden können. Mit diesen Methoden könnte geklärt werden, wann und unter welchen Bedingungen Grx3 Fe/S-Zentren koordiniert. Denkbar wären hier konfokale Aufnahmen im Rahmen von FRET oder Split-GFP-Experimenten. Weiter könnte überprüft werden, ob und unter welchen Bedingungen potentielle Interaktionspartner mit Grx3 über das Fe/S-Zentrum interagieren. Hierzu könnten beispielsweise Co-Immunopräzipitationen nach Behandlung mit den entsprechenden Reagentien durchgeführt werden. Strukturuntersuchungen, z. B. durch Kristallographie oder NMR-Spektroskopie, könnten den Mechanismus bzw. den Vorteil in der Koordination von 2 [2Fe-2S]-Zentren von Grx3 klären.

In vivo konnte humanes Grx3 als zytosolisches und nukleäres Protein identifiziert werden. Derzeit ist der Mechanismus der Translokation von Grx3 in den Kern noch unklar, da Grx3 über keine entsprechende Signalsequenz verfügt. Durch Bestimmung der Lokalisation von Grx3 oder der Etablierung verschiedener Grx3-Deletionsmutanten könnte der Mechanismus

der Translokalisierung geklärt werden, falls Grx3 aktiv in den Kern oder heraus transportiert wird. Ebenfalls könnte versucht werden die Funktion von Grx3 zu klären, indem es mit einer NES versehen wird.

In den durchgeführten Versuchsreihen wiesen HeLa-Zellen mit einer verminderten Grx3-Expression eine erhöhte Migrationsgeschwindigkeit auf. Die erhaltenen Ergebnisse deuteten auf die Sekretion eines bis dato noch unbekannten Faktors X an, der zu der Beschleunigung der Migration führt. Zellexperimente mit T-Zellen könnten zeigen, ob es beispielsweise zu einer Veränderung der Grx3-Expression oder Änderungen im Migrationsverhalten der T-Zellen nach Stimulation der T-Zellen kommt.

Weiter könnte durch eine gezielte Analyse der Kulturmedien von WT-Zellen und Zellen mit verminderter Grx3-Expression der sekretierte Faktor X identifiziert werden.

In der Bäckerhefe konnte gezeigt werden, dass Grx3 an der Verteilung von Eisen und damit vermutlich indirekt an der Verteilung von Fe/S-Zentren beteiligt ist. Nachdem im Rahmen dieser Arbeit diese Ergebnisse in ersten Versuchen bestätigt werden konnten, sollten die Erkenntnisse nun auf das Modellsystem *Danio rerio* erweitert werden, da die im Rahmen dieser Dissertation erzielten Resultate an einem unabhängigen System, welches dem humanen System ähnlicher ist, verifiziert werden könnten. Ferner könnte durch enzymatische Tests der Einfluss von Grx3 auf die Hämbiosynthese untersucht werden.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass Grx3 in zahlreiche biologische Prozesse in der Zelle involviert ist. Derzeit rückt die Entdeckung der Regulationsmechanismen von Grx3-abhängigen Prozessen in den Mittelpunkt neuerer Untersuchungen.

Literaturverzeichnis

- [1] Holmgren, A. *Thioredoxin and Glutaredoxin Systems*. J. Biol. Chem. **264**(24), 13963–13966 (1989).
- [2] Vlamis-Gardikas, A., Holmgren, A. *Thioredoxin and Glutaredoxin isoforms*. Meth. Enzymol. **347**, 286–296 (2002).
- [3] Fernandes, A. P., Holmgren, A. *Glutaredoxins: glutathione dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system*. Antioxid. Redox Signal. **6**(1), 63–74 (2004).
- [4] Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., Lönn, M. E., Hudemann, C., Lillig, C. H. *Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems*. Biochem. Soc. Trans. **33**(6), 1375–1377 (2005).
- [5] Lillig, C. H., Holmgren, A. *Thioredoxin and related molecules - from biology to health and disease*. Antioxid. Redox Signal. **9**(1), 25–47 (2007).
- [6] Holmgren, A., Söderberg, B., Eklund, H., Bränden, C. *Three-dimensional structure of Escherichia coli thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **72**(6), 2305–2309 (1975).
- [7] Holmgren, A. *Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide*. Structure **3**(3), 239–243 (1995).
- [8] Martin, J. L. *Thioredoxin-a fold for all reasons*. Structure **3**(3), 245–250 (1995).
- [9] Eklund, H., Cambillau, C., Sjöberg, B. M., Holmgren, A., Jörnvall, H., Höög, J. O., Bränden, C. I. *Conformational and functional similarities between glutaredoxin and thioredoxins*. EMBO J. **3**(7), 1443–1449 (1984).
- [10] Sodano, P., Xia, T. H., Bushweller, J. H., Björnberg, O., Holmgren, A., Billeter, M., Wüthrich, K. *Sequence-specific 1H n.m.r. assignments and determination of the three-dimensional structure of reduced Escherichia coli glutaredoxin*. J. Mol. Biol. **221**(4), 1311–1324 (1991).

- [11] Choi, H. J., Kang, S. W., Yang, C. H., Rhee, S. G., Ryu, S. E. *Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 20 Å resolution*. Nat. Struct. Biol. **5**(5), 400–406 (1998).
- [12] Reinemer, P., Dirr, H. W., Ladenstein, R., Schäffer, J., Gallay, O., Huber, R. *The three dimensional structure of class pi glutathione S-transferase in complex with glutathione sulfonate at 2.3 Å resolution*. EMBO J. **10**(8), 1997–2005 (1991).
- [13] Martin, J. L., Bardwell, J. C. A., Kuriyan, J. *Crystal structure of the DsbA protein required for disulphide bond formation in vivo*. Nature **365**, 464–468 (1993).
- [14] Epp, O., Ladenstein, R., Wendel, A. *The refined structure of selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution*. Eur. J. Biochem. **133**, 51–69 (1983).
- [15] Kemmink, J., Darby, N. J., Dijkstra, K., Nilges, M., Creighton, T. E. *The folding catalyst protein disulfide isomerase is constructed of active and inactive thioredoxin modules*. Curr. Biol. **7**, 239–245 (1997).
- [16] McCarthy, A. A., Haebel, P. W., Törrönen, A., Rybin, V., Baker, E. N., Metcalf, P. *Crystal structure of the protein disulfide bond isomerase, DsbC, from Escherichia coli*. Nat. Struct. Biol. **7**(3), 196–199 (2000).
- [17] Ashley, R. H. *Challenging accepted ion channel biology: p64 and the CLIC family of putative intracellular anion channel proteins*. Mol. Membr. Biol. **20**(1), 1–11 (2003).
- [18] Qi, Y., Grishin, N. *Structural classification of thioredoxin-like fold proteins*. Proteins **58**(2), 376–388 (2005).
- [19] Holmgren, A. *Thioredoxin*. Annu. Rev. Biochem. **54**, 237–271 (1985).
- [20] Balatri, E., Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., Coifi-Baffoni, S. *Solution structure of Sco1: a thioredoxin-like protein involved in cytochrome c oxidase assembly*. Structure **11**(11), 1431–1443 (2003).
- [21] Fomenko, D. E., Gladyshev, V. N. *Identity and functions of CxxC-derived motifs*. Biochemistry **42**(38), 11214–11225 (2003).
- [22] Berndt, C., Lillig, C. H., Holmgren, A. *Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems-implications for diseases in the cardiovascular system*. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. **292**, 1227–1236 (2007).

- [23] Roos, G., Garcia-Pino, A., Van-Belle, K., Brosens, E., Wahni, K., Vandenbussche, G., Wyns, L., Loris, R., Messens, J. *The conserved active site proline determines the reducing power of Staphylococcus aureus Thioredoxin.* J. Mol. Biol. **368**, 800–811 (2007).
- [24] Holmgren, A. *Hydrogen donor systems for Escherichia coli ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **73**(7), 2275–2279 (1976).
- [25] Yang, Y. S., Wels, W. W. *Catalytic mechanism of thioltransferase.* J. Biol. Chem. **266**(19), 12766–12771 (1991).
- [26] Buschweiler, J. H., Aslund, F., Wüthrich, K., Holmgren, A. *Structural and functional characterization of the mutant Escherichia coli glutaredoxin (C14-S) and its mixed disulfide with Glutathione.* Biochemistry **31**, 9288–9293 (1992).
- [27] Gravina, S. A., Mieyal, J. J. *Thioltransferase is a specific glutathionyl mixed disulfide oxidoreductase.* Biochemistry **32**(13), 3368–3376 (1993).
- [28] Lundström-Ljung, J., Holmgren, A. *Glutaredoxin accelerates glutathione-dependent folding of reduced ribonuclease A together with protein disulfide-isomerase.* J. Biol. Chem. **270**(14), 7822–7828 (1995).
- [29] Strinivasan, U., Mieyal, P. A., Mieyal, J. J. *PH profiles indicative of rate-limiting nucleophilic displacement in thioltransferase catalysis.* Biochemistry **36**, 3199–3206 (1997).
- [30] Yang, Y., Jao, S. C., Nanduri, S., Starke, D. W., Mieyal, J. J., Qin, J. *Reactivity of the human thioltransferase (glutaredoxin) C7S, C25S, C78S, C82S mutant in NMR solution structure of its glutathionyl mixed disulfide intermediate reflect catalytic specificity.* Biochemistry **37**(49), 17145–17156 (1998).
- [31] Kallis, G. B., Holmgren, A. *Differential reactivity of the functional sulfhydryl groups of cysteine-32 and cysteine-35 present in the reduced form of thioredoxin from Escherichia coli.* J. Biol. Chem. **255**(21), 10261–10265 (1980).
- [32] Meister, A. *Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals.* J. Biol. Chem. **269**(13), 9397–9400 (1994).
- [33] Lillig, C. H., Berndt, C., Holmgren, A. *Glutaredoxin Systems.* Biochim. Biophys. Acta **1780**, 1304–1317 (2008).
- [34] Holmgren, A. *Bovine Thioredoxin system.* J. Biol. Chem. **252**(13), 4600–4606 (1977).

- [35] Lillig, C. H., Berndt, C. *Thioredoxins and Glutaredoxins. Functions and metal ion interaction.* Met. Ions Life Sci **5**, 413–439 (2009).
- [36] Laurent, T. C., Moore, E. C., Reichard, P. *Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. IV. Isolation and characterization of thioredoxin the hydrogen donor from Escherichia coli B.* J. Biol. Chem. **239**(10), 3436–3444 (1964).
- [37] Moore, E. C., Reichard, P., Thelander, L. *Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides, V. Purification and properties of thioredoxin reductase from Escherichia coli B.* J. Biol. Chem. **239**(10), 3445–3452 (1964).
- [38] Blombäck, B., Blombäck, M., Finkbeiner, W., Holmgren, A., Kowalska-Loth, B., Olovson, G. *Enzymatic reduction of disulfide bonds in fibrinogen by the thioredoxin system. I. Identification of reduced bonds and studies on reoxidation process.* Thromb. Res. **4**(1), 55–57 (1974).
- [39] Holmgren, A. *Reduction of disulfides by thioredoxin. Exceptional reactivity of insulin and suggested functions of thioredoxin in mechanism of hormone action.* J. Biol. Chem. **254**(18), 9113–9119 (1979).
- [40] Holmgren, A., Ohlsson, I., Grankvist, M. L. *Thioredoxin from Escherichia coli. Radioimmunological and enzymatic determinations in wild type cells and mutants defective in phage T7 DNA replication.* J. Biol. Chem. **253**(2), 430–436 (1978).
- [41] Mark, D. F., Richardson, C. C. *Escherichia coli thioredoxin: a subunit of bacteriophage T7 DNA polymerase.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **73**(3), 780–784 (1976).
- [42] Nordström, B., Randahl, H., Slaby, I., Holmgren, A. *Characterization of bacteriophage T7 DNA polymerase purified to homogeneity by antithioredoxin immunoabsorbent chromatography.* J. Biol. Chem. **256**(6), 3112–3117 (1981).
- [43] Arnér, E. S. J., Holmgren, A. *Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase.* Eur. J. Biochem. **267**, 6102–6109 (2000).
- [44] Nakamura, H., Nakamura, K., Yodoi, J. *Redox regulation of cellular activation.* Annu. Rev. Immunol. **15**, 351–369 (1997).
- [45] Pekkari, K., Holmgren, A. *Truncated thioredoxin: physiological functions and mechanism.* Antioxid. Redox Signal. **6**(1), 53–61 (2004).
- [46] Powis, G., Montfort, W. R. *Properties and biological activities of thioredoxins.* Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **41**, 261–295 (2001).

- [47] Holmgren, A. *Thioredoxin. 6. The amino acid sequence of the protein from Escherichia coli B*. Eur. J. Biochem. **6**(4), 475–484 (1968).
- [48] Eklund, H., Gleason, F. K., Holmgren, A. *Structural and functional relations among thioredoxins in different species*. Proteins **11**(1), 13–28 (1991).
- [49] Masutani, H., Hirota, K., Sasada, T., Ueda-Taniguchi, Y., Taniguchi, Y., Sono, H., Yodoi, J. *Transactivation of an inducible anti-oxidative stress protein, human thioredoxin by HTLV-I tax*. Immunol. Lett. **54**, 67–71 (1996).
- [50] Rubartelli, A., Bajetto, A., Allavena, G., Wollman, E., Sitia, R. *Secretion of thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway*. J. Biol. Chem. **267**(34), 21461–21464 (1992).
- [51] Hansen, J. M., Go, Y. M. *Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol **46**, 215–234 (2006).
- [52] Liu, Y., Wang, M. *Thioredoxins promotes ASK1 ubiquitination and degradation to inhibit ASK1-mediated apoptosis in a redox activity-independent manner*. Circ. Res. **90**, 1259–1266 (2002).
- [53] Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., Ichijo, H. *Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK)1*. EMBO J. **17**(9), 2596–2606 (1998).
- [54] Nishiyama, A., Matsui, M., Iwata, S., Hirota, K., Masutani, H., Nakamura, H., Takagi, Y., Sono, H., Gon, Y., Yodoi, J. *Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression*. J. Biol. Chem. **274**(31), 21645–21650 (1999).
- [55] Junn, E., Han, S., Im, J. Y., Yang, Y., Cho, E., Um, H., Kim, D. K., Lee, K. W., Han, P. L., Rhee, S. G., Choi, I. *Vitamin D3 up-regulated protein 1 mediates oxidative stress via suppressing the thioredoxin function*. J. Immunol. **164**(12), 6287–6295 (2000).
- [56] Yamanaka, H., Maehira, F., Oshiro, M., Asato, T., Yanagawa, Y., Takei, H., Nakashima, Y. *A possible interaction with VDUP1 in HeLa cells detected in a Yeast two-hybrid system*. Biochim. Biophys. Res. Commun. **271**(3), 796–800 (2000).
- [57] Nonn, L., Williams, R. R., Erickson, R. P., Powis, G. *The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly and early embryonic lethality in homozygous mice*. Mol. Cell. Biol. **23**(3), 916–922 (2003).

- [58] Lundström, J., Holmgren, A. *Protein disulfide-isomerase is a substrate for thioredoxin reductase and has thioredoxin-like activity.* J. Biol. Chem. **265**(16), 9114–9120 (1990).
- [59] Luthman, M., Holmgren, A. *Glutaredoxin from calf thymus. Purification to homogeneity.* J. Biol. Chem. **257**(12), 6686–6690 (1982).
- [60] Nikitovic, D., Holmgren, A. *S-nitrosoglutathione is cleaved by the thioredoxin system with liberation of glutathione redox regulating nitric oxide.* J. Biol. Chem. **271**(32), 19180–19185 (1996).
- [61] Sandalova, T., Zhong, L., Lindqvist, Y., Holmgren, A., Schneider, G. *Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: Implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **98**(17), 9533–9538 (2001).
- [62] Holmgren, A. *Glutathione dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Characterization of the enzymatic mechanism of Escherichia coli glutaredoxin.* J. Biol. Chem. **254**(9), 3672–3678 (1979).
- [63] Holmgren, A. *Glutathione dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Purification and characterization of the enzymatic mechanism of glutaredoxin from Escherichia coli.* J. Biol. Chem. **254**(9), 3664–3671 (1979).
- [64] Ahn, B. Y., Moss, B. *Glutaredoxin homolog encoded by vaccinia virus is a virion-associated enzyme with thioltransferase and dehydroascorbate reductase activities.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **89**, 7060–7064 (1992).
- [65] Minakuchi, K., Yabushita, T., Masumura, T., Ichihara, K., Tanaka, K. *Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding rice glutaredoxin.* FEBS Lett. **337**, 157–160 (1994).
- [66] Wanger, W., Follmann, H. *A thioredoxin from green algae.* Biochim. Biophys. Res. Commun. **77**(3), 1044–1051 (1977).
- [67] Gan, Z. R., Polokoff, M. A., Jacobs, J. W., Sardana, M. K. *Complete amino acid sequence of yeast thioltransferase (glutaredoxin).* Biochim. Biophys. Res. Commun. **168**(3), 944–951 (1990).
- [68] Padilla, C. A., Martínez-Galisteo, E., Bárcena, J. A., Spyrou, G., Holmgren, A. *Purification from placenta, amino acid sequence, structure comparisons and cDNA cloning of human glutaredoxin.* Eur. J. Biochem. **227**(1), 27–34 (1995).

- [69] Molina-Navarro, M. M., Casas, C., Piedrafita, L., Belli, G., Herrero, E. *Prokaryotic and eukaryotic monothiol glutaredoxins are able to perform the functions of Grx5 in the biogenesis of Fe/S clusters in yeast mitochondria.* FEBS Lett. **580**, 2273–2280 (2006).
- [70] Wingert, R. A., Galloway, J. L., Barut, B., Foott, H., Fraenkel, P., Axe, J. L., Weber, G. J., Dooley, K., Davidson, A. J., Schmidt, B., Paw, B. H., Shaw, G. C., Kingsley, P., Palis, J., Schubert, H., Chen, O., Kaplan, J. *Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis.* Nature **436**(18), 1035–1039 (2005).
- [71] Herrero, E., de la Torre-Ruiz, M. A. *Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions.* Cell. Mol. Life Sci. **64**(12), 1518–1530 (2007).
- [72] Padilla, C. A., Martinez-Galisteo, E., Lopez-Barea, J., Holmgren, A., Barcena, J. A. *Immunolocalization of thioredoxin and glutaredoxin in mammalian hypophysis.* Mol. Cell. Endocrinol. **85**(1–2), 1–12 (1992).
- [73] Pai, H. V., Starke, D. W., Lesenefsky, E., Hoppel, C. L., Mieyal, J. J. *What is the functional significance of the unique location of Glutaredoxin 1 (GRx1) in the intermembrane space of mitochondria?* Antioxid. Redox Signal. **9**(11), 2027–2034 (2007).
- [74] Lundberg, M., Fernandes, A. P., Kumar, S., Holmgren, A. *Cellular and plasma levels of human glutaredoxin 1 and 2 detected by sensitive ELISA systems.* Biochim. Biophys. Res. Commun. **319**(3), 801–809 (2004).
- [75] Auwerx, J., Isacson, O., Söderlund, J., Balzarini, J., Johansson, M., Lundberg, M. *Human glutaredoxin-1 catalyzes the reduction of HIV-1 gp120 and CD4 disulfides and its inhibition reduces HIV-1 replication.* Int. J. Biochem. Cell Biol. **41**(6), 1269–1275 (2009).
- [76] Takashima, Y., Hirota, K., Nakamura, H., Nakamura, T., Akiyama, K., Cheng, F. S., Maeda, M., Yodoi, J. *Differential expression of glutaredoxin and thioredoxin during monocytic differentiation.* Immunol. Lett. **68**(2–3), 397–401 (1999).
- [77] Bandyopadhyay, S., Starke, D. W., Mieyal, J. J., Gronostajski, R. M. *Thioltransferase (glutaredoxin) reactivates the DNA-binding activity of oxidation-inactivated nuclear factor I.* J. Biol. Chem. **273**(1), 392–397 (1998).
- [78] Hirota, K., Matsui, M., Murata, M., Takashima, Y., Cheng, F., Itoh, T., Fukuda, K., Yodoi, J. *Nucleoredoxin, glutaredoxin, and thioredoxin differentially regulate NF- κ B, AP-1, and CREB activation in HEK293 cells.* Biochim. Biophys. Res. Commun. **275**(1), 177–182 (2000).

- [79] Nakamura, T., Ohno, T., Hirota, K., Nishiyama, A., Nakamura, H., Wada, H., Yodoi, J. *Mouse glutaredoxin-cDNA cloning high level expression in E. coli and its possible implication in redox regulation of the DNA binding activity in transcription factor PEBP2*. Free Radic. Res. **31**(4), 357–365 (1999).
- [80] Wells, W. W., Xu, D. P., Yang, Y. F., Rocque, P. A. *Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity*. J. Biol. Chem. **265**(26), 15361–15364 (1990).
- [81] Chrestensen, C. A., Starke, D. W., Mieyal, J. J. *Acute cadmium exposure inactivates thioltransferase (glutaredoxin), inhibits intracellular reduction of protein-glutathionyl-mixed disulfides, and initiate apoptosis*. J. Biol. Chem. **275**(34), 26556–26565 (2000).
- [82] Daily, D., Vlamis-Gardikas, A., Offen, D., Mittelmann, L., Melamed, E., Holmgren, A., Barzilai, A. *Glutaredoxin protects cerebellar granulae neurons from dopamine-induced apoptosis by activating NF κ B via Ref-1*. J. Biol. Chem. **276**(2), 1335–1344 (2001).
- [83] Beer, S. M., Taylor, E. R., Brown, S. E., Dahm, C. C., Costa, N. J., Runswick, M. J., Murphy, M. P. *Glutaredoxin 2 catalyzes the reversible oxidation and glutathionylation of mitochondrial membrane thiol proteins*. J. Biol. Chem. **279**(46), 47939–47951 (2004).
- [84] Taylor, E. R., Hurrell, F., Shannon, R. J., Lin, T. K., Hirst, J., Murphy, M. P. *Reversible glutathionylation of complex I increases mitochondrial superoxide formation*. J. Biol. Chem. **278**(22), 19603–19611 (2003).
- [85] Johansson, C., Lillig, C. H., Holmgren, A. *Human mitochondrial glutaredoxin reduces S-glutathionylated proteins with high affinity accepting electrons from either glutathione or thioredoxin reductase*. J. Biol. Chem. **279**(9), 7537–7543 (2004).
- [86] Lillig, C. H., Lönn, M. E., Fernandes, A. P., Holmgren, A. *Short interfering RNA-mediated silencing of glutaredoxin 2 increases the sensitivity of HeLa cells toward doxorubicin and phenylarsine oxide*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **101**(36), 13227–13232 (2004).
- [87] Bachur, N., Gordon, S., Gee, M. *Anthracycline antibiotic augmentation of microsomal electron transport and free radical formation*. Mol. Pharmacol. **13**, 1695–1705 (1977).
- [88] Gutierrez, P. L., Gee, M. V., Bachur, N. R. *Kinetics of anthracycline antibiotic free radical formation and reductive glycosidase activity*. Arch Biochem Biophys **223**(1), 68–75 (1983).

- [89] Davies, K., Doroshow, J., Hochstein, P. *Mitochondrial NADH dehydrogenase-catalyzed oxygen radical production by adriamycin and the relative inactivity of 5-iminodaunorubicin*. FEBS Lett **153**(1), 227–230 (1983).
- [90] Pallis, M., Bradshaw, T. D., Westwell, A. D., Grunzy, M., Stevens, M. F. G., Russel, N. *Induction of apoptosis without redox catastrophe by thioredoxin-inhibitory compounds*. Biochem. Pharmacol. **66**(9), 1695–1705 (2003).
- [91] Lillig, C. H., Berndt, C., Vergnolle, O., Lönn, M. E., Hudemann, C., Bill, E., Holmgren, A. *Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: a possible role as redox sensor*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **102**(23), 8168–8173 (2005).
- [92] Rodríguez-Manzanique, M. T., Ros, J., Cabisco, E., Sorribas, A., Herrero, E. *Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. **19**(12), 8180–8190 (1999).
- [93] Rodríguez-Manzanique, M. T., Tamarit, J., Belli, G., Ro, J., Herrero, E. *Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes*. Mol. Biol. Cell **13**, 1109–1121 (2002).
- [94] Witte, S., Villalba, M., Bi, K., Liu, Y., Isakov, N., Altman, A. *Inhibition the c-Jun N-terminal Kinase AP-1 and NF- kappaB pathways by PICOT, a novel protein kinase C-interacting protein with a thioredoxin homology domain*. J. Biol. Chem. **275**(3), 1902–1909 (2000).
- [95] Schafer, F. Q., Buettner, G. R. *Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple*. Free Radic. Biol. Med. **30**(11), 1191–1212 (2001).
- [96] Yositate, S., Nanri, H., Fernando, M. R., Minakami, S. *Possible differences in the regenerative roles played by thioltransferase and thioredoxin for oxidatively damaged proteins*. J. Biochem. **116**(1), 42–46 (1994).
- [97] Wang, J., Boja, E. S., Tan, W., Tekle, E., Fales, H. M., English, S., Mieyal, J. J., Chock, P. B. *Reversible glutathionylation regulates actin polymerization in A431 cells*. J. Biol. Chem. **276**(51), 47763–47766 (2001).
- [98] Lind, C., Gerdes, R., Schuppe-Koistinen, I., Cotgreave, I. A. *Studies on the mechanism of oxidative modification of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by glutathione: catalysis by glutaredoxin*. Biochim. Biophys. Res. Commun. **247**, 481–486 (1998).

- [99] Klatt, P., Pineda-Molina, E., de Lacoba, M. G., Padilla, A. C., Martinez-Galisteo, E., Barcena, J. A., Lamas, S. *Redox regulation of c-Jun DNA binding by reversible S-glutathionylation*. FASEB J. **13**, 1481–1490 (1999).
- [100] Pineda-Molina, E., Klatt, P., Vazquez, J., Marina, A., da Lacoba, M. G., Perez-Sala, D., Lamas, S. *Glutathionylation of the p50 subunit of NF- κ -B: a mechanism for redox-induced inhibition of DNA binding*. Biochemistry **40**(47), 14134–14142 (2001).
- [101] Sadek, C. M., Damdimopoulos, A. E., Pelto-Huikko, M., Gustafsson, J. A., Spyrou, G., Miranda-Vizuet, A. *Sptrx-2, a fusion protein composed of one thioredoxin and three tandemly repeated NDP-kinase domains is expressed in human testis germ cells*. Genes Cells **6**, 1077–1091 (2001).
- [102] Jimenez, A., Zu, W., Rawe, V. Y., Pelto-Huikko, M., Flickinger, C. J., Sutovsky, P., Gustafsson, J. A., Oko, R., Miranda-Vizuet, A. *Spermatocyte/Spermatid-specific thioredoxin-3, a novel Golgi apparatus-associated thioredoxin, is a specific marker of aberrant spermatogenesis*. J. Biol. Chem. **279**(33), 34971–34978 (2004).
- [103] Stanchi, F., Bertocco, E., Rosario, T., Simionati, B., Cannata, N., Zimbello, R., Lanfanchi, G., Valle, G. *Characterization of 16 novel human genes showing high similarity to yeast sequences*. Yeast **18**, 69–80 (2001).
- [104] Babichev, Y., Isakov, N. *Tyrosine phosphorylation of PICOT and its translocation to the nucleus in response of human T cells to oxidative stress*. Adv. Exp. Anu. Biol. **495**, 41–45 (2001).
- [105] Zhang, S. W., Garcia-Gras, E., Wycuff, D. R., Marriot, S., Kadeer, N., Yu, W. Y., Olson, E. N., Garry, D. J., Parmack, M. S., Schwartz, R. J. *Identification of direct serum-response factor gene targets during Me2SO-induced P19 cardiac cell differentiation*. J. Biol. Chem. **280**(19), 19115–19126 (2005).
- [106] Jeong, D., Cha, H., Kim, E., Kang, M., Yang, D. K., Kim, J. M., Yoon, P. O., Oh, J. G., Bernecker, O. Y., Sakata, S., Lee, T. T., Cui, L., Lee, Y. H., Kim do, D. H., Woo, S. H., Liao, R., Hajjar, R. J., Park, W. J. *PICOT inhibits cardiac hypertrophy and enhances ventricular function and cardiomyocyte contractility*. Circ. Res. **99**, 307–314 (2006).
- [107] Samarel, A. M. *PICOT: A Multidomain scaffolding inhibitor of hypertrophic signal transduction*. Circ. Res. **102**, 625–627 (2008).

- [108] Jeong, D., Kim, J. M., Cha, H., Oh, J. G., Park, J., Yun, S. H., Ju, E. S., Hajjar, R. J., Park, W. J. *PICOT attenuates cardiac hypertrophy by disrupting calcineurin NFAT signaling.* Circ. Res. **102**, 711–719 (2008).
- [109] Cha, H., Kim, J. M., Oh, J. G., Park, S. P., Park, J., Jeong, H. J., Park, B. K., Lee, Y. H., Jeong, D., Yang, D. K., Bernecker, Q. Y., Kim, D. H., Hajjar, R. J., Park, W. J. *PICOT is a critical regulator of cardiac hypertrophy and cardiomyocyte contractility.* J. Mol. Cell. Cardiol. **45**(6), 796–803 (2008).
- [110] Beinert, H. *Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises.* J. Biol. Inorg. Chem. **5**(1), 2–15 (2000).
- [111] Lill, R., Mühlenhoff, U. *Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and disease.* Annu. Rev. Biochem. **77**, 669–700 (2008).
- [112] Johnson, D. C., Dean, D. R., Smith, A. D., Johnson, M. K. *Structure, Function, and formation of biological iron-sulfur clusters.* Annu. Rev. Biochem. **74**, 247–281 (2005).
- [113] Mühlenhoff, U., Lill, R. *Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria.* Biochim. Biophys. Acta **1459**, 370–382 (2000).
- [114] Rouault, T. A., Tong, W. *Iron-sulfur cluster biogenesis and human disease.* Trends Genet. **24**, 398–407 (2008).
- [115] Balk, J., Lobreaux, S. *Biogenesis of iron-sulfur proteins in plants.* Trends Plant Sci. **10**(7), 324–331 (2005).
- [116] Blattner, F. R., Plunkett 3rd, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., Shao, Y. *The complete genome sequence of Escherichia coli K-12.* Science **277**(5331), 1453–1462 (1997).
- [117] Zheng, L., Cash, V. L., Flint, D. H., Dean, D. R. *Assembly of Iron-Sulfur Clusters: Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from Azotobacter vinelandii.* J. Biol. Chem. **273**(21), 13264–13272 (1998).
- [118] Flint, D. H. *Escherichia coli contains a Protein that is homologous in function and N-terminal sequence to the protein encoded by the nifS Gene of Azotobacter vinelandii and that can participate in the synthesis of the Fe-S Cluster of Dihydroxy-acid Dehydratase.* J. Biol. Chem. **271**(27), 16068–16074 (1996).

- [119] Agar, J., Krebs, C., Frazzon, J., Huynh, B. H., Dean, D. R., Johnson, M. K. *IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU*. *Biochemistry* **39**(27), 7856–7862 (2000).
- [120] Mansy, S. S., Wu, G., Surerus, K. K., Cowan, J. A. *Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis: Thermotoga maritima IscU is a structured Iron-Sulfur Cluster Assembly Protein*. *J. Biol. Chem.* **277**(24), 21397–21404 (2002).
- [121] Bilder, P. W., Ding, H., Newcomer, M. E. *Crystal Structure of the ancient, Fe-S scaffold IscA reveals a novel protein fold*. *Biochemistry* **43**(1), 133–139 (2004).
- [122] Bertini, I., Cowan, J. A., Bianco, C. D., Luchinat, C., Mansy, S. S. *Thermatoga maritima IscU. Structural characterization and dynamics of a new class of metallochaperone*. *J. Mol. Biol.* **331**(4), 907–924 (2003).
- [123] Xu, X. M., Müller, S. G. *Iron-Sulfur Cluster Biogenesis Systems and their Crosstalk*. *ChemBioChem* **9**(15), 2355–2362 (2008).
- [124] Bandyopadhyay, S., Gama, F., Molina-Navarro, M. M., Gualberto, J. M., Claxton, R., Naik, S. G., Huynh, B. H., Herrero, E., Jacqout, J. P., Johnson, M. K., Rouhier, N. *Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe-2S] clusters*. *EMBO J.* **27**, 1122–1133 (2008).
- [125] Fontecave, M. *Mechanisms of iron-sulfur cluster assembly: the SUF machinery*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **10**, 713–721 (2005).
- [126] Lill, R., Kispal, G. *Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria*. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 352–356 (2000).
- [127] Mühlenhoff, U., Gerber, J., Richardt, N., Lill, R. *Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold Isu1p*. *EMBO J.* **22**(18), 4815–4825 (2003).
- [128] Alves, R., Herrero, E., Sorribas, A. *Predictive reconstruction of the mitochondrial iron-sulfur cluster assembly metabolism: II. Role of glutaredoxin Grx5*. *Proteins* **57**, 481–492 (2004).
- [129] Vilella, F., Alves, R., Rodriguez-Manzanique, M. T., Belli, G., Swaminathan, S., Sunnerhagen, P., Herrero, E. *Evolution and cellular function of monothiol glutaredoxins: involvement in iron-sulphur cluster assembly*. *Comp. Funct. Genomics* **5**(4), 328–341 (2004).

- [130] Camaschella, C., Campanella, A., de Falco, L., Boschetto, L., Merlini, R., Silvestri, L., Levi, S., Iolascon, A. *The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload.* Blood **110**(4), 1353–1358 (2007).
- [131] Cheng, N. H., Liu, J. Z., Brock, A., Nelson, R. S., Hirschi, K. *AtGRXcp, an Arabidopsis chloroplastic Glutaredoxin, is critical for protection against protein oxidative damage.* J. Biol. Chem. **281**(36), 26280–26288 (2006).
- [132] Braun, V. *Iron uptake by Escherichia coli.* Front. Biosci. **8**, 1409–1421 (2003).
- [133] Fernandes, A. P., Fladvad, M., Berndt, C., André sen, C., Lillig, C. H., Neubauer, P., Sunnerhagen, M., Holmgren, A., Vlamis-Gardikas, A. *A novel monothiol Glutaredoxin (Grx4) from Escherichia coli can serve as a substrate for thioredoxin reductase.* J. Biol. Chem. **280**(26), 24544–24552 (2005).
- [134] Rutherford, J. C., Bird, A. J. *Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells.* Eukaryotic Cell **3**(1), 1–13 (2004).
- [135] Kaplan, J., Ward, D. M. V., Crisp, R. J., Philpott, C. C. *Iron-dependent metabolic remodeling in S. cerevisiae.* Biochim. Biophys. Acta **1763**, 646–651 (2006).
- [136] Chen, E., Ekker, S. C. *Structural and functional characterization of the mutant Escherichia coli glutaredoxin (C14S) and its mixed disulfide with glutathione.* Curr Pharm Biotechnol **5**, 409–413 (2004).
- [137] Ojeda, L., Keller, G., Mühlenhoff, U., Rutherford, J. C., Lill, R., Winge, D. R. *Role of Glutaredoxin-3 and Glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 Transcriptional activator in Saccharomyces cerevisiae.* J. Biol. Chem. **281**(26), 17661–17669 (2006).
- [138] Pujol-Carrion, N., Belli, G., Herrero, E., Nogues, A., de la Torre-Ruiz, M. A. *Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in Saccharomyces cerevisiae.* J. Cell. Sci. **119**, 4554–4564 (2006).
- [139] Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., Andrews, N. C. *Balancing Acts: Molecular control of mammalian iron metabolism.* Cell **117**, 285–297 (2004).
- [140] Pantopoulos, K. *Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update.* Ann. N. Y. Acad. Sci. **1012**, 1–13 (2004).
- [141] Rouault, T. A. *The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease.* Nat. Chem. Biol. **2**(8), 406–414 (2006).

- [142] Adlard, P. A., Bush, A. I. *Metals and Alzheimer's disease*. J. Alzheimers Dis. **10**(2–3), 145–163 (2006).
- [143] Magaki, S., Raghavan, R., Mueller, C., Oberg, K. C., Vinters, H. V., Kirsch, W. M. *Iron, copper, and iron regulatory protein 2 in Alzheimer's disease and related dementias*. Neurosci. Lett. **418**(1), 72–76 (2007).
- [144] Bharat, S., Hsu, M., Kaur, D., Rajagopalan, S., Andersen, J. K. *Glutathione, iron and Parkinson's disease*. Biochem. Pharmacol. **64**, 1037–1048 (2002).
- [145] Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M. D., Pianese, L., Cossee, M., et al., F. C. *Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion*. Science **271**(5254), 1423–1427 (1996).
- [146] Cossee, M., Durr, A., Schmitt, M., Dahl, N., Trouillas, P., Allinson, P., et al. *Friedreich's ataxia point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes*. Ann. Neurol. **45**(2), 200–206 (1999).
- [147] J. Sambrook, T. Maniatis, E. F. F. *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour New York **1–3** (1989).
- [148] Hanahan, D. *Techniques for transformation*. In: DNA-cloning Vol. 1, ed. by Glover, D.M., IRL Press, Oxford, 109–135 (1985).
- [149] Chu, G., Hayakawa, H., Berg, P. *Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA*. Nucleic Acids Res. **15**(3), 1311–1326 (1987).
- [150] Mullis, K., Faloona, F., Saiki, R., Horn, G., Ehrlich, H. *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **51**, 263–273 (1986).
- [151] Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R., Pullen, J., Pease, L. *Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction*. Gene **77**, 51–59 (1989).
- [152] Horton, R. M., Pease, L. R. *Recombination and mutagenesis of DNA using PCR*. Direct Mutagenesis, ed. by Mc Phearson, M.J. IRL Press, Oxford 217–247 (1991).
- [153] Lämmli, U. K. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature **227**(259), 680–685 (1970).
- [154] Fish, W. W. *Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples*. Meth. Enzymol. **158**, 357–364 (1988).

- [155] Beinert, H. *Semi-micro-Methods for analysis of labile sulfides and of labile sulfide plus sulfane sulfur in unusually stable iron-sulfur proteins*. Anal. Biochem. **131**, 373–378 (1983).
- [156] Broderick, J. B., Henshaw, T. F., Cheek, J., Wojtuszewik, K., Smith, S. R., Trojan, M. R., McGhan, R. M., Kopf, M., Kibbey, M., Broderick, W. E. *Pyruvate formate-Lyase-Activating Enzyme: Strictly anaerobic isolation yields active enzyme containing a $[3\text{Fe-4S}]^+$ Cluster*. Biochem. Biophys. Res. Comm. **269**(2), 451–456 (2000).
- [157] Balk, J., Pierik, A. J., Aguilar Netz, D. J., Mühlenhoff, U., Lill, R. *Nar1p, a conserved eukaryotic protein with similarity to Fe-only hydrogenases, functions in cytosolic iron-sulphur protein biogenesis*. Biochem. Soc. Trans. **33**, 86–89 (2005).
- [158] Pierik, A. J., Hagen, W. R., Redeker, J. S., Wolbert, R. B., Boesma, M., Verhagen, M. F., Grande, H. J., Veeger, C., Mutsaers, P. H., Sands, R. H., Dunham, W. R. *Redox properties of the iron-sulfur clusters in activated Fe-hydrogenase from Desulfovibrio vulgaris (Hildenborough)*. Eur. J. Biochem. **209**, 63–72 (1992).
- [159] Godoy, J., Funke, M., Ackermann, W., Haunhorst, P., Oesteritz, S., Capani, F., Elsässer, H. P., Lillig, C. H. *Redox atlas of the mouse: Immunohistochemical detection of glutaredoxin-, peroxiredoxin-, and thioredoxin-family proteins in various tissues of the laboratory mouse*. Biochim. Biophys. Acta doi:10.1016/j.bbagen.2010.05.006 (2010).
- [160] Hudemann, C., Lönn, M. E., Godoy, J. R., Avval, F. Z., Capani, F., A., H., H., L. C. *Identification, expression pattern and characterization of mouse glutaredoxin 2 isoforms*. Antioxid. Redox Signal. **11**(1), 1–14 (2009).
- [161] Siegel, L. M. *A direct microdetermination for sulfide*. Anal. Biochem. **11**, 126–132 (1965).
- [162] Biederbick, A., Stehling, O., Rösser, R., Niggemeyer, B., Nakai, Y., Elsässer, H. P., Lill, R. *Role of human mitochondrial Nfs1 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis and iron regulation*. Mol. Cell. Biol. **26**, 5675–5687 (2006).
- [163] Müllner, E. W., Neupert, B., Kühn, L. C. *A specific mRNA binding factor regulates the iron-dependent stability of cytoplasmic transferrin receptor mRNA*. Cell **58**, 373–382 (1989).
- [164] Haunhorst, P., Berndt, C., Eitner, S., Godoy, J. R., Lillig, C. H. *Characterization of the human monothiol glutaredoxin 3 (PICOT) as iron-sulfur protein*. Biochim. Biophys. Res. Commun. **394**(2), 372–376 (2010).

- [165] Jeong, W., Yoon, H., Lee, S., Rhee, S. *Identification and characterization of TRP14, a thioredoxin-related protein of 14 kDa. New insights into the specificity of thioredoxin function.* J. Biol. Chem. **279**(5), 3142–3150 (2004).
- [166] Baier, G., Telford, D., Giampa, L., Coggeshall, K. M., Baier-Bitterlich, G., Isakov, N., Altman, A. *Molecular cloning and characterization of PKC- θ , a novel member of the Protein Kinase C (PKC) gene family expressed predominantly in hematopoietic cells.* J. Biol. Chem. **268**(7), 4997–5004 (1993).
- [167] Baier-Bitterlich, G., Überall, F., Bauer, B., Fresser, F., Wachter, H., Grünicke, H., Utermann, G., Altman, A., Baier, G. *Protein Kinase C- θ Isoenzyme selective stimulation of the transcription factor complex AP-1 in T-Lymphocytes.* Mol. Cell. Biol. **16**(4), 1842–1850 (1996).
- [168] Ghaffari-Tabrizi, N., Bauer, B., Altman, A., Utermann, G., Überall, F., Baier, G. *Protein kinase C- θ , a selective upstream regulator of JNK/SAPK and IL-2 promotor activation in Jurkat T cells.* Eur. J. Immunol. **29**(1), 132–142 (1999).
- [169] Werlen, G., Jacinto, E., Xia, Y., Karin, M. *Calcineurin preferentially synergizes with PKC- θ to activate JNK and IL-2 promotor in T-Lymphocytes.* EMBO J **17**(11), 3101–3111 (1998).
- [170] Monks, C. R. F., Kupfer, H., Tamir, I., Barlow, A., Kupfer, A. *Selective modulation of protein kinase C- θ during T-cell activation.* Nature **385**, 83–86 (1997).
- [171] Kato, J., Kobune, M., Ohkubo, S., Fujikawa, K., Tanaka, M., Takimoto, R., Takada, K., Takahari, D., Kawano, Y., Kohgo, Y., Niitsu, Y. *Iron/IRP-1-dependent regulation of mRNA expression for transferrin receptor, DMT1 and ferritin during human erythroid differentiation.* Exp. Hematol. **35**, 879–887 (2007).
- [172] Mühlenhoff, U., Molik, S., Godoy, J. R., Uzarska, M. A., Richter, N., Seubert, A., Zhang, Y., Stubbe, J., Pierrel, F., Herrero, E., Lillig, C. H., Lill, R. *Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster.* Cell Metab. accepted (2010).
- [173] Martelli, A., Wattenhofer-Donze, M., Schmucker, S., Bouvet, S., Reutenauer, L., Puccio, H. *Frataxin is essential for extramitochondrial Fe-S cluster proteins in mammalian tissues.* Hum. Mol. Genet. **16**, 2651–2658 (2007).

- [174] Zhou, G., Broyles, S. S., Dixon, J. E., Zalkin, H. *Avian glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase propeptide processing and activity are dependent upon essential cysteine residues.* J. Biol. Chem. **267**(11), 7936–7942 (1992).
- [175] Theil, E. C., Matzapetakis, M., Liu, X. *Ferritins: iron/oxygen biominerals in protein nanocages.* J. Biol. Inorg. Chem. **11**, 803–810 (2006).
- [176] Ponka, P., Lok, C. N. *The transferrin receptor: role in health and disease.* Int. J. Biochem. Cell Biol. **31**, 1111–1137 (1999).
- [177] Rouhier, N., Unno, H., Bandyopadhyay, S., Masip, L., Kim, S. K., Hirasawa, M., Gualberto, J. M., Lattard, V., Kusunoki, M., Knaff, D. B., Georgiou, G., Hase, T., Johnson, M. K., Jacquot, J. P. *Functional, structural, and spectroscopic characterization of a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster in poplar glutaredoxin C1.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **104**(18), 7379–7384 (2007).
- [178] Picciocchi, A., Saguez, C., Boussac, A., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F. *CGFS-type monothiol glutaredoxins from the cyanobacterium Synechocystis PCC6803 and other evolutionary distant model organisms possess a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster.* Biochemistry **46**, 15018–15026 (2007).
- [179] Johansson, C., Kavanagh, K. L., Gileadi, O., Oppermann, U. *Reversible sequestration of active site cysteines in a 2F-2S-bridging dimer provides a mechanism for glutaredoxin 2 regulation in human mitochondria.* J. Biol. Chem. **282**(5), 3077–3082 (2007).
- [180] Huber, H. E., Russel, M., Model, P., Richardson, C. C. *Interaction of mutant thioredoxins of Escherichia coli with the gene 5 protein of Phage T7. The redox capacity of thioredoxin is not required for stimulation of DNA-Polymerase activity.* J. Biol. Chem. **261**(32), 15006–15012 (1986).
- [181] Häberlein, I., Würfel, M., Follmann, H. *Non-redox protein interactions in the thioredoxin activation of chloroplast enzymes.* Biochim. Biophys. Acta **1121**(3), 293–296 (1992).
- [182] Johnson, M. K., Rouhier, N., Bandyopadhyay, S., Gama, F., Molina-Navarro, M. M., Gualberto, J. M., et al. *Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe-2S] clusters.* EMBO J. **27**, 1122–1133 (2008).
- [183] Li, H., Mapolelo, D. T., Dingra, N. N., Naik, S. G., Lees, N. S., Hoffmann, B. M., et al. *The yeast iron regulatory proteins Grx3/4 and Fra2 from heterodimeric complexes containing a [2Fe-2S] cluster with cysteinyl and histidyl ligation.* Biochemistry **48**, 9569–9581 (2009).

- [184] Hoff, K. G., Culler, S. J., Nguyen, P. Q., McGuire, R. M., Silberg, J. J., Smolke, C. D. *In vivo fluorescent detection of Fe-S clusters coordination by human Grx2*. Chemistry and Biology **16**(12), 1299–1308 (2009).
- [185] Fazilleau, N., McHeyzer-Williams, L., Rosen, H., McHeyzer-Williams, M. *The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding*. Nat. Immunol **10**(4), 375–384 (2009).
- [186] Mebius, M. R., Kraal, G. *Structure and function of the spleen*. Nat. Rev. Immunol. **5**, 606–616 (2005).
- [187] Molina, M. M., Bellí, G., de la, M. A. T., Rodríguez-Manzanque, M. T., Herero, E. *Nuclear monothiol glutaredoxins of Saccharomyces cerevisiae can function as mitochondrial glutaredoxins*. J. Biol. Chem. **279**(50), 51923–51930 (2004).
- [188] Lopreiato, R. *Analysis of the interaction between piD261/Bud32, an evolutionarily conserved protein kinase of Saccharomyces cerevisiae, and the Grx4 glutaredoxin*. Biochem. J. **377**(2), 395–405 (2004).
- [189] Philpott, C., Protchenko, O. *Response to iron deprivation in Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryot. Cell **7**, 20–27 (2008).
- [190] Kaplan, C. D., Kaplan, J. *Iron acquisition and transcriptional regulation*. Chem. Rev. **109**, 4536–4552 (2009).
- [191] Kumánovics, A., Chen, O. S., Li, L., Bagley, D., Adkins, E. M., Lin, H., Dingra, N. N., Outten, C. E., Keller, G., Winge, D., Ward, D. M., Kaplan, J. *Identification of Fra1 and Fra2 as genes involved in regulating the yeast iron regulon in response to decreased mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis*. J. Biol. Chem. **283**(16), 10276–10286 (2008).
- [192] Griendling, K. K., Fitzgerald, G. A. *Oxidative stress and cardiovascular injury. Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS*. Circ **108**, 1912–1916 (2003).
- [193] Francis, G. S. *Pathophysiology of chronic heart failure*. Am. J. Med. **110**, 37S–46S (2001).
- [194] Ide, T., Tsutsui, H., Kinugawa, S., Suematsu, N., Hayashidani, S., Ichikawa, K., Utsumi, H., Machida, Y., Egashira, K., Takeshita, A. *Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium*. Circ. Res. **86**, 152–157 (2000).

- [195] Levine, B., Kalman, J., Mayer, L., Fillit, H. M., Packer, M. *Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure*. N. Engl. J. Med. **323**, 236–341 (1990).
- [196] Shioji, K., Kishimoto, C., Nakamura, H., Masutani, H., Yuan, Z., Oka, S. I., Yodoi, J. *Overexpression of Thioredoxin-1 in transgenic mice attenuates adriamycin-induced cardiotoxicity*. Circulation **106**, 1403–1409 (2002).
- [197] Kishimoto, C., Shioji, K., et al Nakamura, H. *Serum thioredoxin (TRX) levels in patients with heart failure*. Jpn. Circ. J. **65**, 491–494 (2001).
- [198] Wang, Y., de Keulenaer, G. W., Lee, R. T. *Vitamin D(3)-up-regulated protein-1 is a stress-responsive gene that regulates cardiomyocyte viability through interaction with thioredoxin*. J. Biol. Chem. **277**, 26496–26500 (2002).
- [199] Kuster, G. M., Pimental, D. R., Adachi, T., Ido, Y., Brenner, D. A., Cohen, R. A., Liao, R., Siwik, D. A., Colucci, W. *Alpha-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes is mediated via thioredoxin-1-sensitive oxidative modification of thiols on ras*. Circulation **111**(9), 1192–1198 (2005).
- [200] Yoshioka, J., Schulze, C., Cupesi, M., Sylvan, J. D., MacGillivray, C., Gannon, J., Huang, H., Lee, R. T. *Thioredoxin-interacting protein controls cardiac hypertrophy through regulation of thioredoxin activity*. Circulation **109**, 2581–2586 (2004).
- [201] Yamamoto, M., Yang, G., Hong, C., Liu, J., Holle, E., Yu, X., Wagner, T., Vatner, S. F., Sadoshima, J. *Inhibition of endogenous thioredoxin in the heart increases oxidative stress and cardiac hypertrophy*. J. Clin. Invest. **112**(9), 1395–13406 (2003).
- [202] Driest, S. L. V., Gakh, O., Ommen, S. R., Isaya, G., Ackerman, M. J. *Molecular and functional characterization of a human frataxin mutation found in hypertrophy cardiomyopathy*. Mol. Gen. Metab. **85**, 280–285 (2005).
- [203] Lodi, R., Rajagopalan, B., Blamire, A. M., Cooper, J. M., Davies, C. H., Bradley, J. L., Styles, P., Schapira, A. H. V. *Cardiac energetics are abnormal in Friedreich ataxia patients in the absence of cardiac dysfunction and hypertrophy: An in vivo ³¹P magnetic resonance spectroscopy study*. Cardiovasc. Res. **52**, 111–119 (2001).
- [204] Condò, I., Malisan, F., Guccini, I., Serio, D., Rufini, A., Testi, R. *Molecular control of the cytosolic aconitase/IRP1 switch by extramitochondrial frataxin*. Hum. Mol. Genet. **19**(7), 1221–1229 (2010).

- [205] Masutani, H., Ueda, S., Yodoi, J. *The thioredoxin system in retroviral infection and apoptosis*. Cell Death Differ. **12**, 991–998 (2005).
- [206] Tagaya, Y., Maeda, Y., Mitsui, A., Kondo, N., Matsui, H., Hamuro, J., Brown, N., Arai, K., Yokota, T., Wagasugi, H., Yodoi, J. *ATL- derived factor (ADF) an IL-2 receptor/Tac inducer homologous to thioredoxin, possible involvement of dithiol-reduction in the IL-2 receptor induction*. EMBO J. **8**, 757–764 (1989).
- [207] Ahsan, M. K., Masutani, H., Yamaguchi, Y., Kim, Y. C., Nosaka, K., Matsuoka, M., Nishinaka, Y., Maeda, M., Yodoi, J. *Loss of interleukin-2-dependency in HTLV-1-infected T cells on gene silencing of thioredoxin-binding protein-2*. Oncogene **25**, 2181–2191 (2006).
- [208] Nishinaka, Y., Nishiyama, A., Masutani, H., Oka, S., Ahsan, K., Nakayama, Y., Ishii, Y., Nakamura, H., Maeda, M., Yodoi, J. *Loss of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D3 up-regulated protein 1 in human T-cell leukemia virus type I-dependent T-cell transformation: implications for adult T-cell leukemia leukemogenesis*. Cancer Res. **64**, 1287–1292 (2004).
- [209] Davis, D. A., Newcomb, F. M., Starke, D. W., Ott, D. E., Mieyal, J. J., Yarchoan, R. *Thioltransferase (glutaredoxin) is detected within HIV-1 and can regulate the activity of glutathionylated HIV-1 protease in vitro*. J. Biol. Chem. **272**(41), 25935–42590 (1997).
- [210] Strell, C., Lang, K., Niggemann, B., Zaenker, K. S., Entschladen, F. *Neutrophil granulocytes promote the migration activity of MDA-MB-468 human breast carcinoma cells via ICAM-1*. Exp. Cell Res. **316**(1), 138–148 (2010).
- [211] Sumagin, R., Lomakina, E., Sarelius, I. H. *Leukocyte-endothelial cell interaction are linked to vascular permeability via ICAM-1-mediated signaling*. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. **295**(3), H926–H927 (2008).
- [212] Cotran, R. S., Pober, J. *Cytokine-endothelial interactions in inflammation, immunity, and vascular injury*. J. Am. Soc. Nephrol. **1**, 225–235 (1990).
- [213] Bevilacqua, M. P. *Endothelial-leukocyte adhesion molecules*. Annu. Rev. Immunol. **1**, 767–804 (1993).
- [214] Dunon, D., Piali, L., Imhof, B. A. *To stick or not to stick: The new leukocyte homing paradigm*. Curr. Opin. Cell. Biol. **8**, 714–723 (1996).

- [215] Verbeek, M. M., Westphal, J. R., Ruiter, D. J., de Waal, R. M. *T lymphocyte adhesion to human brain pericytes is mediated via very late antigen 4/vascular cell adhesion molecule-1 interactions.* J. Immunol. **154**, 5876–5884 (1995).
- [216] Wagener, F. A. D. T. G., Feldman, E., de Witte, T., Abraham, N. G. *Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E Selectin in vascular endothelial cells.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **216**(3), 456–463 (1997).
- [217] Jeffrey, K. L., Camps, M., Rommel, C., Mackay, C. R. *Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune response.* Nature Reviews **6**, 391–403 (2007).
- [218] Gozzelino, R., Jeney, V., Soares, M. P. *Mechanisms of cell protection by Heme Oxygenase-1.* Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **50**, 323–354 (2010).
- [219] Willis, D., Moore, A. R., Frederick, R., Willoughby, D. A. *Heme oxygenase: A novel target for the modulation of inflammatory response.* Nat. Med. **2**, 87–93 (1996).
- [220] Belcher, J. D., Mahaseth, H., Welch, T. E., Otterbein, L. E., Hebbel, R. P., Vercellotti, G. M. *Heme oxygenase-1 is a modulator of inflammation and vaso-occlusion in transgenic sickle mice.* J. Clin. Invest. **116**(3), 808–816 (2006).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich insbesondere bei Herrn Dr. Lillig für die Übernahme des Hauptreferates bedanken. Weiter möchte ich mich bei ihm für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation in seinem Labor anfertigen zu dürfen. Danke für zahlreiche Diskussionen, gute Forschungsbedingungen sowie die Betreuung im Allgemeinen und dafür das er mir bei Fragen aller Art hilfreich zur Seite stand.

Frau Prof. Dr. Regine Kahmann danke ich für die Übernahme der Position der Koreferentin meiner Arbeit. Ebenfalls möchte ich ihr für die sehr gute Betreuung meiner Arbeit danken. Bei allen Mitgliedern der AG Lillig möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken; dem Marburg-Team: Valeria Cherkasov, Dr. Jose Godoy, Lena Schütte, Maria Funke, Maren Werling, Susanne Eitner, Eva-Maria Hanschmann und Cathi Cott und dem Schweden-Team: Dr. Maria E. Lönn und Dr. Christoph Hudemann. Dr. Carsten Berndt danke ich für zahlreiche Tipps und seine tatkräftige Unterstützung. Ein besonderer Dank geht an dieser Stelle an Sabrina Oesteritz, die mir im Laboralltag tatkräftig zur Seite stand.

Bei den Mitgliedern der AG Jakob, der AG Lill und der AG Elsässer möchte ich mich für die super Arbeitsatmosphäre, die gegenseitige Unterstützung im Laboralltag und den Spaß auf gemeinsamen Grillabenden und Parties bedanken. An dieser Stelle möchte ich Frau Dr. Catharina Delebinski und Frau Dr. Alexandra Elli für viele gemeinsame Abende danken. Alexandra, wir haben es geschafft fast jede Lokalität in Marburg zu testen.

Meinen Freunden, die mir während der Promotionszeit immer zur Seite standen, möchte ich ebenfalls von ganzem Herzen danken. Ein besonderer Dank geht an dieser Stelle an Frau Dr. Beyhan Ertas. Danke für die zahlreichen aufbauenden, langen Telefonate. Dr. Jan-Erik Heil danke ich für die Unterstützung bei allen Problemen, die im Rahmen einer Doktorarbeit so anfallen.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium und damit auch die Promotion ermöglicht haben und dafür das sie und meine Schwester mich während der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und immer wieder aufgebaut haben. Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Mann Christian bedanken, der mich, wo es nur eben ging, unterstützt hat und mir immer wieder den Rücken freigehalten hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Haunhorst
Vorname:	Petra
Geburtstag:	24.08.1978
Geburtsort:	Georgsmarienhütte
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Konfession:	röm. katholisch
Familienstand:	verheiratet

Bildung

Aug. 1985 - Juli 1989	Grundschule Gellenbeck, Hagen a.T.W.
Aug. 1989 - Juli 1991	Orientierungsstufe, Hagen a.T.W.
Aug. 1991 - Juni 1995	Realschule, Hagen a.T.W.
Aug. 1995 - Juni 1998	Gymnasium Carolinum, Osnabrück Abschluss: Abitur
Okt. 1998 - Dez. 2004	Studium an der Universität Osnabrück
Okt. 1998 - Dez. 2004	Lehramt Gymnasium: Biologie, Mathematik
Okt. 2001 - Aug. 2004	Diplom Biologie, Abschluss: Diplom in Biologie
Jan. 2005 - Juni 2006	wissenschaftliche Mitarbeiterin an der TU Kaiserslautern
seit Okt. 2006	wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Philipps-Universität Marburg

Anhang

Tabelle 1: Differentielle Genexpression nach Reduktion des Grx3-Levels: Bezug auf alle Gene zwischen Δ_{pos} von 0,54 und Δ_{neg} von $-0,5$.

Microarray: Zytoskelett			
Abkürzung	Name	GenID	Änderung (log2)
HPD	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	3242	3,53
TMEM16B	Transmembrane protein 16B	57101	2,62
MXRA5	matrix-remodelling associated 5	25878	2,55
MYL9	Myosin, light chain 9, regulatory	10398	2,5
KRT17	Keratin17	3872	2,48
HMOX1	Heme oxygenase 1	3162	2,43
MYLK3	Myosin light chain kinase 3	91807	2,35
CD24	CD24 Molekül	100133941	2,33
CRLF1	Cytokine receptor-like factor1	9244	2,3
WFDC1	WAP four-disulfide core domain 1	58189	2,27
KRT80	Kreatin 80	14459	2,22
CRABP2	Cellular retinoic acid binding protein 2	1382	2,2
ACTC1	Actin, alpha, cardiac muscle 1	70	2,17
SNCA	Synuclein, alpha	6622	2,15
THBS1	Thrombosporin 1	7057	2,1
C5AR1	complement component 5a receptor 1	728	2,08
MPPED2	Metallophosphoesterase domain containing 2	744	2,05
CFL2	Cofilin 2	1073	2,03
CES3	Carboxylesterase3	23491	2,02
GPR1	G protein-coupled receptor 1	2825	2,01

ANKRD1	Ankyrin repeat domain 1	27063	2
ANXA3	Annexin A3	301	2
DDR2	discoidin domain receptor tyrosine kinase2	4921	1, 99
KAL1	Kallmann syndrome 1 sequence	3730	1, 99
PPP2R2B	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B beta isoform	5521	1, 98
CYP24A1	cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1	1591	1, 98
EEF1A2	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	1917	1, 96
MATN2	matrilin2	4147	1, 95
TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	7078	1, 95
COL15A1	collagen, type XV, alpha 1	1306	1, 95
PDGFRL	platelet-derived growth factor receptor-like	5157	1, 95
CYR61	cysteine-rich, angionic inducer 61	3491	1, 93
FOSB	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	2354	1, 93
PDGFRB	Platelet-derived growth factor receptor beta polypeptide	5159	1, 93
EPGN	epithelial mitogen homolog	255324	1, 93
FBN2	Fibrillin 2	2201	1, 92
FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	2353	1, 92
SYNC1	Syncoilin, intermediate filament 1	81493	1, 91
SCN9A	sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha subunit	6335	1, 9
LPHN1	LPHN1	22859	1, 88
CRB1	crumbs homolog1	23418	1, 87
HSPG2	Heparan sulfate proteoglycan 2	3339	1, 87
LAMB2	laminin, beta 2	3913	1, 87
MSLN	Mesothelin	10232	1, 87
SESN3	Sestrin3	143686	1, 84
CCDC80	coiled-coil domain containing80	151887	1, 84
TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2	7077	1, 84

TGFBI	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	7045	1, 83
TRIM45	triarlite motif-containing 45	80263	1, 82
CXXC5	CXXC finger 5	51523	1, 82
AHSA2	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 2	130872	1, 82
CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	1545	1, 82
ITGA1	Integrin A1	3672	1, 82
SERPINE1	serpin peptidase inhibitor, clade E	5054	1, 82
SORBS2	sorbin and SH3 domain containing 2	8470	1, 81
HHIPL2	HHIP-like2	79802	1, 8
CRIP2	cystein-rich protein 2	1397	1, 8
FADS3	Fatty acid desaturase 3	3995	1, 79
JUB	jub, ajuba homolog (<i>Xenopus laevis</i>)	84962	1, 79
NPY1R	neuropeptide Y receptor Y1	4886	1, 79
WISP2	WNT1 inducible signaling pathway protein 2	8839	1, 79
CAV1	Caveolin 1 Caveolae protein	857	1, 78
SDC2	Syndecan-2	6383	1, 77
NPR1	natriuretic peptide receptor A/guanylate cyclase A	4881	1, 77
PDGFA	platelet-derived growth factor alpha polypeptide	5154	1, 77
KIF13A	Kinesin family member 13A	63971	1, 76
IL18	interleukin18	3606	1, 75
USH1C	Usher syndrome 1C	10083	1, 75
CCNL2	cyclin L2	81669	1, 75
SNORD34	small nucleolar RNA, C/D box34	26817	1, 74
TPM2	Tropomyosin 2	7169	1, 74
RPL13A	ribosomal protein L13a	23521	1, 72
JOSD3	Josephin domain containing 3	79101	1, 69
SYNPO	synaptopodin	11346	1, 69
BMP1	bone morphogenetic protein 1	649	1, 68
FAM38A	family with sequence similarity 38, member A	9780	1, 66

NPR3	natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase C	4883	1,66
CLTCL1	clathrin, heavy chain-like 1	8218	1,64
ALDOC	aldolase C, fructose-biphosphate	230	0,62
LMO7	LIM domain 7	4008	0,62
SLPI	secretory leukocyte peptidase inhibitor	6590	0,61
NT5E	5'-nucleotidase, ecto	4907	0,61
HIG2	Hypoxia-inducible protein 2	29923	0,61
LIPG	lipase, endothelial	9388	0,61
UHMK1	U2AF homology motif (UHM) kinase 1	127933	0,61
AHCYL2	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 2	23382	0,61
PHLDA1	pleckstrin homology-like domain, family A, member1	22822	0,61
TNIP1	TNFAIP3 interacting protein 1	10318	0,61
DOCK7	dedicator of cytokinesis 7	85440	0,6
PLEK2	Plekstrin 2	26499	0,6
HK2	hexokinase2	3099	0,6
DCBLD2	Discoidin, CUB and LCCL domain containing 2	131566	0,59
TFPI2	tissue factor pathway inhibitor 2	7980	0,59
CTSS	cathepsin S	1520	0,59
BCAR3	breast cancer anti-estrogen resistance 3	8412	0,59
CA12	carbonic anhydrase XII	771	0,59
GPRC5A	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A	9052	0,59
TYMP	thymidine phosphorylase	1890	0,59
CXCR4	chemokine (C-X-C) motif receptor 4	7852	0,58
UPRT	uracil phosphoribosyltransferase (FUR1) homolog (S. cerevisiae)	139596	0,58
FERMT1	Fermitin family homolog 1 (Drosophila)	55612	0,58
VWA5A	von Willebrand factor A domain containing 5A	4013	0,58
ETS1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog1	2113	0,58
SLC1A1	solute carrier family1	6505	0,58

ETV4	ets variant gene 4	2118	0, 58
IL4R	Interleukin 4 Rezeptor	3566	0, 58
IRX3	iroquois homeobox 3	79191	0, 58
PPFIBP1	PTPRF interacting protein, binding protein 1	8496	0, 58
SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 9	6662	0, 58
NDUFS2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein	4720	0, 58
PDK1	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	5163	0, 58
IRAK2	interleukin-1 receptor-associated kinase 2	3656	0, 57
MAFF	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)	23764	0, 57
SLC7A2	solute carrier family 7	6542	0, 57
ETV1	ets variant gene 1	2115	0, 57
STK38L	Serin/threonin Kinase 38 like	23012	0, 57
DOCK4	dedicator of cytokinesis 4	9732	0, 57
VEGFC	vascular endothelial growth factor c	7424	0, 57
TMOD1	tropomodulin 1	7111	0, 57
IER3	immediate early response 3	8870	0, 57
AKR1C2	aldo-keto reductase family 1, member C2	1646	0, 57
DUSP6	dual specificity phosphatase 6	1848	0, 56
CCNG2	cyclin G2	901	0, 56
GLRX	glutaredoxin	2745	0, 56
FGD4	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 4	121512	0, 56
FOXL1	forkhead box L1	2300	0, 56
ICAM1	intracellular adhesion molecule 1	3383	0, 56
SQRDL	sulfide quinone reductase-like	58472	0, 56
MPZL2	Myelin protein zero-like 2	10205	0, 56
SEMA4B	sema domain, immunoglobulin 4B	10509	0, 56
LRRC8C	leucine rich repeat containing 8 family, member C	84230	0, 55
FOXD1	forkhead box D1	2297	0, 55
C3	complement component 3	718	0, 53
RDHE2	epidermal retinal dehydrogenase 2	195814	0, 55

RELB	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B	5971	0,55
SDC4	Syndecan-4	6385	0,55
ZNF395	zinc finger protein 395	55893	0,55
ANXA10	annexin A10	11199	0,54
DUSP4	dual specificity phosphatase 4	1846	0,54
NXPH4	neurexophilin 4	11247	0,54
PRDM1	PR domain containing 1, with ZNF domain	639	0,54
MYEOV	myeloma overexpressed gene	26579	0,54
HBEGF	heparin-binding EGF-like growth factor	1839	0,53
TRPV3	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 3	162514	0,52
SPRY1	sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling	10252	0,52
MXI1	MAX interactor 1	4601	0,52
ADM	adrenomedullin	133	0,52
FST	folistatin	10468	0,52
SLC16A6	solute carrier family 16, member 6	9120	0,51
ITGB4	Integrin beta 4	3691	0,51
PKIA	protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor alpha	5569	0,51
PLAT	plasminogen activator, tissue	5327	0,51
AKR1C1	aldo-keto reductase family 1, member C1	1645	0,51
ANGPTL4	angiopoietin-like 4	51129	0,51
MAOB	monoamine oxidase B	4129	0,51
BIRC3	baculoviral IAP repeat containing 3	330	0,5
INSIG2	insulin induced gene 2	51141	0,49
KLF5	Kruppel-like factor 5	688	0,49
ENO2	enolase 2	2026	0,49
ADFP	adipose differentiation-related protein	123	0,48
RASD1	RAS, dexamethasone-induced 1	51655	0,48
CDCP1	CUB domain containing protein 1	64866	0,48
STC1	stanniocalcin 1	6781	0,48
KIAA1199	KIA1199	57214	0,47
CLEC2B	C-type lectin domain family 2, member B	9976	0,46

IFGBP1	insulin-like growth factor binding protein 1	16006	0,45
EGLN3	egl nine homolog 3	112399	0,45
ITGA2	Integrin alpha 2	3673	0,43
IL8	Interleukin 8	3576	0,42
Fos	v-fos FBJ murine osteosarcom viral oncogene homolog	2353	0,42
TMEM158	transmembrane protein 158	25907	0,41
CA9	carbonic anhydrase IX	768	0,4
ERRFI1	ERBB receptor feedback inhibitor 1	54206	0,39
IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3	3486	0,39
NDRG1	N-myc downstream regulated gene 1	10397	0,27
Grx3	Glutaredoxin 3	10539	0,15